

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



## TESIS DOCTORAL

**Análisis genético y funcional de biomarcadores en cáncer colorrectal y estudio proteómico del papel de snail en fibroblastos tumorales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alberto Peláez García**

Directores

José Ignacio Casal Álvarez  
Rodrigo Barderas Manchado

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**ANÁLISIS GENÉTICO Y FUNCIONAL DE  
BIOMARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL Y  
ESTUDIO PROTEÓMICO DEL PAPEL DE SNAIL EN  
FIBROBLASTOS TUMORALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADO POR

**Alberto Peláez García**

BAJO LA DIRECCION DE LOS DOCTORES

**José Ignacio Casal Álvarez  
Rodrigo Barderas Manchado**

**Madrid, 2015**



El Dr. José Ignacio Casal Álvarez, jefe del grupo de Proteómica Funcional del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid y el Dr. Rodrigo Barderas Machado, investigador Ramón y Cajal del Depto. De Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM.

#### CERTIFICAN

Que el trabajo titulado: “**Análisis genético y funcional de biomarcadores en cáncer colorrectal y estudio proteómico del papel de Snail en fibroblastos tumorales**”, que presenta Alberto Peláez García para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el grupo de Proteómica Funcional del CIB de Madrid y reúne la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid a 2 de Marzo de 2015.

Dr. José Ignacio Casal Álvarez

Dr. Rodrigo Barderas Manchado





Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Economía con el proyecto BIO2012-31023, proyectos para grupos estables de la asociación española contra el cáncer (AECC), el proyecto Colomics S2011/BMD2344 de la comunidad de Madrid y el apoyo de ProteoRed del Instituto de Salud Carlos III.

Alberto Peláez García ha disfrutado de una beca FPI del Ministerio de Economía y Competitividad y una beca de la Sociedad Española de Proteómica (Seprot) para una estancia breve de 3 meses en la Universidad de Ginebra (Suiza).



**A Sandra, mis padres y Javier**



## **AGRADECIMIENTOS**



Gracias a todos los que me han ayudado a poder realizar esta tesis doctoral.

A mis directores de tesis  
Al laboratorio de Proteómica funcional y el CIB  
Al apoyo de mis padres, Sandra y mi hermano





## **RESUMEN**



Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent cancer in the western world. The development of the disease takes decades and involves multiple sequential events. CRC is the most prevalent cancer in Spain, with an incidence of 32.240 new cases in 2012, and the second cancer in mortality rate because most of the patients are diagnosed at advanced stages due to the general reluctance to use invasive diagnostic tools like colonoscopy. Currently, CRC research focuses on i) the identification of biomarkers to detect early stages to improve the survival of CRC patients, and ii) the discovery of new therapeutic targets for a more effective chemotherapy. These objectives require a deep knowledge of CRC regarding the biology of the primary tumor, tumor microenvironment and the metastatic process.

Biomarkers are specific markers of biological and/or pathological stages. Cancer biomarkers are used for diagnosis and prognosis, to stratify patients and to identify recurrences of the disease. Actually, only few proteins have been described as biomarkers in CRC, among others: carcinoembryonic antigen (CEA), CA19.9 and CA125, although none of them is recommended for clinical screening. Blood is the optimal source for the diagnostic screening of large human populations based on non-invasive markers. Moreover, blood circulation facilitates the contact with every body tissue, including representative tumour antigens. Then, the implementation of simpler and non-invasive methods for the early detection of CRC should be based on the identification of proteins or antibodies in serum or plasma. However, these tumour antigens are probably present at a very low range of concentration in plasma and they probably suffer from extensive proteolysis in a relative short period of time; making the search for tumour-specific antigens a complicated task. Accordingly, the humoral response produced against tumour-associated antigens should be an alternative to the detection of tumour antigens in blood for the development of diagnostic tools. Indeed, autoantibodies can be detected at early cancer stages and prior to cancer diagnosis, revealing their potential as biomarkers.

Self-proteins (autoantigens) altered during tumour formation and progression by specific point mutations, misfolding, overexpression, aberrant modifications as truncation or degradation, or different combinations of these factors, can be the target of autoantibodies in cancer patients. In fact, several tumour associated autoantigens

(TAAs): i.e. p53, HER2, NY-ESO1 or MUC1 have been previously identified in different studies involving autoantibody screening in CRC and other tumours. The discovery of autoantibodies and their target tumor-associated antigens has been revitalized in the last years by the use of high-throughput proteomic approaches, including protein microarrays.

Protein microarrays provide a platform for the identification of both autoantibodies and their respective TAAs for diagnosis purposes by the screening of serum from cancer patients. Previously, we have used commercially available high-density protein microarrays (Protoarrays) and home-made T7-phage microarrays for the identification of autoantibody signatures and tumour-associated antigens in colorectal cancer. Our results confirmed the presence of a specific autoantibody signature for CRC with the potential to diagnose the disease with a higher specificity and sensitivity than previously reported CRC serum markers. Furthermore, since most of the identified TAAs were kinases (FGFR4, STK4 or PIM1), we hypothesized that they could be implicated in CRC progression or being new therapeutic targets of the disease. In addition, one intriguing question not yet solved is how the autoimmune response to tumour-associated antigens occurs. Little is known about the mechanism of immune recognition of altered gene or protein products, despite their potential relevance to tumour immunity, autoimmunity and for diagnosis.

On the other hand, proteomics is actively used for the identification of cancer associated biomarkers and for cancer characterization involving to primary tumour, tumour stroma or metastasis. In depth genetic studies followed by cell-biology analyses demonstrate that tumour growth is not just determined by malignant cancer cells themselves, but also by the tumour stroma. The main components of stroma are fibroblasts, which form the structural scaffold and synthesize extracellular matrix (ECM) components, such as collagens and fibronectin. Fibroblasts are the most abundant cell type in connective tissues, and some subpopulations are able to differentiate to other cell types as adipocytes or osteoblasts. In normal conditions, fibroblasts are in an inactive quiescent state; however fibroblasts become activated in wound healing and fibrosis. Fibroblast activation is induced by several stimuli, including growth factors such as TGF- $\beta$ . Furthermore, an increased expression of TGF $\beta$  in colorectal cancer

correlates with the accumulation of fibrotic desmoplastic tissue. Snail1 transcription is up-regulated by this cytokine in epithelial cells. In fibroblasts, Snail1 levels are modulated by serum and TGF $\beta$ . In addition, Snail1 is not only up-regulated by TGF- $\beta$ , but also induces the transcription of TGF $\beta$ , creating a self-activation loop for the production of TGF $\beta$ . It is becoming increasingly clear that fibroblasts are modifiers of cancer progression. Moreover, further knowledge of the role of resting and activated fibroblasts in cancer is needed, since recent evidences indicate that subpopulations of fibroblasts, the so-called cancer-associated fibroblasts (CAFs), are important promoters of tumour growth and progression.

The transcription factor Snail1 is a major inducer of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) during embryonic development and cancer progression. Recent reports indicate that Snail ectopic expression in mesenchymal cells abrogated their differentiation to osteoblasts or adipocytes. In addition, Snail1 knock-down caused a large decrease in the number of bone marrow murine mesenchymal stem cells (MSCs). This depletion is accompanied of an acceleration of their differentiation to osteoblasts or adipocytes. In this way, Snail would exert its effect on maintaining stemness and pluripotency in MSCs. Snail effects on adipogenesis have been proposed to be mediated, among others, by a lack of response to TGF $\beta$  or by an apparent inhibition of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  expression. Similar results were obtained in preventing the differentiation of bone marrow-derived murine mesenchymal stem cells (mMSC) to osteoblasts or adipocytes. Still, the molecular mechanisms underlying the effect of Snail on MSCs differentiation and the blocking of adipogenesis are far from being established. Confluent 3T3-L1 preadipocytes and mMSCs differentiate to adipocytes upon exposure to a cocktail of adipogenic inducers. During adipogenic differentiation Snail expression is almost negligible in 3T3-L1 cells. As a consequence, Snail1 expression plays an inhibitory effect on adipocyte differentiation program, suggesting a functional role for Snail in obesity and cachexia. Obesity is associated with incidence of CRC and cancer associated cachexia is responsible for approximately 20% of total deaths in cancer patients. Then, the role of Snail in these processes needs to be further studied.

In this context, the work that makes up this Doctoral Thesis is divided in two well-defined blocks with two main objectives:

1. The first block focused on the study of the basis of the autoimmunity in CRC patients. We aimed to decipher some of the molecular mechanisms that control the induction of an immune response against FGFR4 and PIM1, with the following partial objectives to clarify the alterations in FGFR4 and PIM1 susceptible of inducing the humoral response in CRC:
  - a. To analyse FGFR4 and PIM1 expression levels in CRC cell lines and paired normal/tumoral tissue by immunoblotting, immunohistochemistry and meta-analysis using publicly available databases.
  - b. To analyse for the presence of mutations in the TAAs and/or identify new splice isoforms. We used a collection of tissue and plasma samples from patients with elevated autoantibody responses for mRNA isolation and cDNA sequencing.
  - c. To define the role of wild-type and mutated proteins in tumour progression. We studied the effect of FGFR4 and PIM1 in CRC cell lines through gain-of-function and loss-of-function experiments with stably and transiently transfected with shRNA, siRNA and expression vectors cells. We evaluated cell growth, adhesion, invasion and survival *in vitro* in transfected cells, and tumour growth *in vivo* in Swiss nude mice subcutaneously injected with cells to analyse the relevance of FGFR4 and PIM1.
2. In the second block, we investigated those molecules mediating Snail1 transcriptional control for blocking 3T3-L1 and MSC differentiation to adipocytes. As partial objectives, we proposed the following objectives:
  - a. We carried out in-depth quantitative proteomic analysis of Snail-transfected cells to identify the cellular and molecular mechanisms

controlled by Snail. We used either stable isotopic metabolic labeling (SILAC) for 3T3-L1 cells or isobaric labeling with tandem mass tags (TMT) for mMSCs. Since Snail mediates its effects mainly through regulation of other TFs, we focused the proteomic analysis on the nuclear fraction.

- b. Validation of Snail-deregulated proteins in 3T3-L1 and mMSC cells was performed by PCR and WB. *In silico* and experimental analysis revealed putative Snail1 E-box consensus motifs in different promoters of quantified deregulated proteins. We used wild-type 3T3-L1 cells to analyse the effect of siRNAs against various TFs on differentiation.
- c. Characterization of the role of Nr2f6 and IL-17 in adipogenesis and differentiation.

No new SNPs or activating mutations were found in FGFR4. Our results suggest that FGFR4 overexpression is the major determinant to induce a FGFR4 humoral response in CRC patients.

In addition, loss-of-function experiments revealed a major role of FGFR4 in the tumorigenic properties of colorectal cancer cells, since its depletion abrogated proliferation, adhesion, migration and invasion. We identified a new role for FGFR4 as regulator of the epithelial-to-mesenchymal transition and invasion in colorectal cancer. Silencing of FGFR4 in colorectal cancer cells produced a reversion to a more epithelial phenotype and the reduction of tumorigenic properties of colorectal cancer cells. FGFR4 regulated the expression and the stability of TGF $\beta$ , SNAIL and TWIST genes, as well as the MAP kinase (proliferation) and AKT (survival) pathways. Finally, the relevance of FGFR4 as therapeutic target in CRC was demonstrated with specific antibodies and multikinase inhibitors (PD173074 and TKI-258).

Regarding PIM1, we found multiple somatic mutations and the presence of the His48Asp SNP in CRC cell lines and colorectal tumour tissues. PIM1 expression levels analyses on paired tumoral/normal tissue showed an intense staining in tumoral tissues with a more abundant expression in late stages. Our results suggest that overexpression is not the reason for the induction of an immune response. In PIM1, the presence of mutations seems to play a more relevant role in early humoral response.



In addition, we demonstrated the proliferative, invasive and antiapoptotic effects of PIM1 overexpression. We examined the effect of identified PIM1 mutations in CRC cell lines respect to PIM1 wild-type and control. We observed an increased in proliferation, invasion and survival in PIM1 A315T mutant and His48Asp SNP transfected cells. These mutations caused a constitutive activation of the kinase PIM1. Additionally, we studied the frequency of His48Asp SNP in colorectal cancer patients, which was found to not be associated with the clinical outcome of CRC patients.

In conclusion, the combination of different proteomic strategies for the identification of the autoimmune response against TAAs showed not only a great potential for the discovery of new biomarkers for diagnosis and prognosis in cancer, the identification of key players in CRC progression and new therapeutic targets for intervention.

In the second block of this thesis, we used a sensitive and quantitative proteomic analysis to study Snail effects on adipocyte differentiation in mesenchymal cells through the inhibition of the nuclear orphan receptor Nr2f6, which antagonizes the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-17. Snail also inhibited a number of different transcription factors, cytokines, growth factors and immunomodulators. This capacity of Snail to bind and regulate these transcription factors was confirmed by WB, PCR, luciferase and ChIP assays. In addition to the observed repression of TFs, Snail expression increased the abundance of different components of the NurD complex, and other chromatin associated proteins. NuRD belongs to the chromatin remodelling complexes and plays important roles in transcription, chromatin assembly, cell cycle progression and genomic stability.

Collectively, our results suggest an early effect of Snail on adipogenesis, upstream of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  proteins, which would be mediated through Nr2f6 and IL-17. We demonstrated the capacity of Snail to induce IL-17 expression in fibroblasts or mesenchymal cells. These results suggest that the action of IL-17 is more far-reaching than an expression restricted to T lymphocytes and might have an impact on cancer microenvironment.

Our results support a link between Snail1 expression, inflammation and adipogenesis. Snail, as a master regulator, plays a central role at different levels to favour the expression and/or repression of a cascade of multiple transcription factors that control adipogenic gene expression at different levels. Further work is required to define the fine specificity of other identified transcription factors and the cascade of signalling events. These results provide a functional role for Snail in obesity that goes beyond the control of the EMT process and epithelial plasticity.



## **INDICE**



<b>Agradecimientos</b>	<b>9</b>
<b>Resumen</b>	<b>13</b>
<b>Índice</b>	<b>23</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>31</b>
<b>Introducción</b>	<b>35</b>
1. Cáncer Colorrectal	37
1.1. Desarrollo y etiología del cáncer colorrectal	37
1.1.1. CCR con antecedentes familiares	38
1.1.2. CCR hereditario no asociado a poliposis (Síndrome de Lynch)	39
1.1.3. Poliposis Adenomatosa Familiar	39
1.1.4. Síndrome de poliposis con estructura hamartomatosa	39
1.1.5. Cáncer colorrectal esporádico	39
2. Aparición y clasificación del cáncer colorrectal	42
3. Diagnóstico del cáncer colorrectal	43
3.1. Diagnóstico por imagen y endoscopia	44
3.2. Pruebas diagnósticas: FOBT	44
3.3. Diagnóstico molecular. Uso de biomarcadores	45
4. Biomarcadores en CCR	45
4.1. Biomarcadores genéticos	46
4.2. Biomarcadores proteómicos	46
4.2.1. Respuesta humoral en cáncer y autoanticuerpos como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico	46
4.2.2. Antígenos asociados a cáncer colorrectal	48
4.2.2.1. FGFR4 (Receptor del factor de crecimiento de fibroblasto 4)	48
4.2.2.2. PIM1 (Protooncogén serín treonín quinasa 1)	50
5. El microambiente tumoral	52
5.1. La transición epitelio mesénquima y Snail1	53
5.2. Snail1 y su participación en la diferenciación celular de fibroblastos tumorales	55
6. Proteómica y espectrometría de masas	57
6.1. Proteómica cuantitativa	59
<b>Objetivos</b>	<b>63</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>67</b>

7. Datos clínicos de los sueros y muestras tumorales .....	69
8. Líneas celulares .....	70
8.1. Líneas celulares de CCR. ....	70
8.2. Líneas celulares mesenquimales murinas. ....	70
8.3. Otras líneas celulares.....	71
9. Extracción de RNA de tejidos y líneas celulares.....	71
10. Análisis de las secuencias genéticas de FGFR4 y PIM1. ....	71
11. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	73
11.1. PCR semicuantitativa.....	73
11.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	74
11.3. Mutagénesis dirigida por PCR. ....	75
12. Vectores de expresión en células de mamífero y bacteria.....	76
12.1. Vectores para transfección transitoria en células de mamífero: silenciamiento y expresión. ....	76
12.2. Transfección estable en células de mamífero. ....	77
12.3. Vectores de expresión en <i>E. coli</i> . ....	78
13. Expresión de las proteínas en <i>E. coli</i> .....	78
14. Purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis .....	79
15. ELISA para la detección de autoanticuerpos en el suero de los pacientes y ELISA de IL-17 .....	79
16. Inmunodetección de proteínas.....	80
16.1. Anticuerpos .....	80
16.1.1. Anticuerpos primarios.....	80
16.1.2. Anticuerpos secundarios.....	81
16.2. Western Blot. ....	82
16.3. Inmunohistoquímica .....	82
16.4. Microscopia confocal.....	82
16.5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	83
17. Inhibidores .....	83
17.1. Inhibidores de FGFR4 y PIM1 .....	83
17.2. Otros Inhibidores utilizados en líneas celulares de CCR. ....	84
18. Ensayos funcionales in vitro en las líneas celulares.....	85
18.1. Adhesión celular .....	85
18.2. Invasión celular.....	85

18.3. Cierre de herida ("wound healing").....	85
18.4. Proliferación celular .....	86
18.5. Apoptosis celular .....	86
18.6. Formación de colonias en agar blando .....	86
18.7. Ensayo de luciferasa .....	87
18.8. Diferenciación adipocítica en la línea 3T3-L1 .....	88
19. Xenotransplantes tumorales.....	88
20. Array de citoquinas .....	88
21. Análisis proteómico .....	89
21.1. Marcaje metabólico SILAC de las células 3T3-L1 y preparación de los extractos nucleares.....	89
21.2. Espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de proteínas con SILAC. ....	90
21.3. Marcaje isobárico por TMT de las mMSC y análisis LC-MS/MS.....	92
21.4. Análisis por LC-MS/MS de la inmunoprecipitación de FGFR4. ....	93
21.5. Herramientas bioinformáticas. ....	94
22. Análisis estadístico.....	95
<b>Resultados .....</b>	<b>97</b>
23. Análisis genético y funcional de los antígenos asociados a tumor: FGFR4 y PIM1 .....	99
23.1. FGFR4. ....	99
23.1.1. Los pacientes con CCR desarrollan autoanticuerpos frente a FGFR4.. ...	99
23.1.2. FGFR4 aparece sobreexpresado en líneas celulares y tejidos de CCR...100	
23.1.3. El análisis genético de FGFR4 revela la presencia de polimorfismos comunes en líneas celulares y tejido de CCR... ..	102
23.1.4. El silenciamiento de FGFR4 disminuye la capacidad tumorigénica en las líneas celulares de CCR.....	104
23.1.4.1 Silenciamiento de FGFR4 en líneas celulares mediante transfección estable y transitoria.....	104
23.1.4.2 Papel de FGFR4 en la tumorigenicidad de las líneas celulares de CCR.....	105
23.1.4.3 FGFR4 como efector de la transición epitelio-mesénquima. ....	107
23.1.4.4 Efecto de FGFR4 en señalización y supervivencia celular.....	109
23.1.5. FGFR4 como diana terapéutica en cáncer colorrectal.....	111



23.1.5.1. Inhibición de la proliferación celular por inhibidores de quinasas...	111
23.1.5.2. Inhibición de la proliferación celular mediante anticuerpos específicos para FGFR4.....	113
23.1.5.3. Efectos <i>in vivo</i> del silenciamiento de FGFR4.....	114
23.1.6. Identificación de mediadores de la señalización de FGFR4 mediante espectrometría de masas.....	115
23.2.PIM1 .....	117
23.2.1. Respuesta humoral frente a PIM1 en el suero de pacientes con CCR...	117
23.2.2. PIM1 aparece levemente sobreexpresado en tejidos de CCR.....	118
23.2.3. PIM1 presenta una gran variedad de mutaciones somáticas y alteraciones en CCR.....	120
23.2.4. Las alteraciones genéticas descritas en PIM1 modifican las propiedades tumorigénicas de líneas celulares de CCR.....	122
23.2.4.1. Obtención de los mutantes de PIM1 por PCR y clonaje en vector de expresión de mamíferos.....	122
23.2.4.2. La mutación puntual Ala315Thr aumenta las capacidades tumorigénicas de las líneas celulares de CCR.....	123
23.2.4.3. Alteraciones en la supervivencia celular ocasionadas por los mutantes His48Asp y Ala315Thr de PIM1.....	125
23.2.4.4. Análisis <i>in silico</i> de los cambios estructurales de la mutación Ala315Thr.....	127
23.2.4.5. Efecto de la sobreexpresión de PIM1 y sus mutantes sobre las líneas tumorales <i>in vivo</i> .....	128
23.2.5. El polimorfismo His48Asp de PIM1 no posee valor pronóstico en CCR.....	129
24. Caracterización proteómica del papel de Snail1 en la diferenciación de fibroblastos .....	132
24.1.Marcajes isobáricos de las líneas celulares 3T3-L1 y mMSC para su caracterización proteómica. ....	132
24.2.Normalización de los datos y proteínas alteradas por Snail1.....	134
24.3.Análisis de las vías de señalización celular alteradas por la sobreexpresión de Snail1.. ....	136
24.4.Validación de las proteínas diferencialmente reguladas potencialmente implicadas en la diferenciación adipocítica.. ....	138

24.5.El análisis <i>in silico</i> de los potenciales sitios de unión de Snail1 a los promotores de las proteínas desreguladas revela proteínas y factores de transcripción cuya expresión es controlada por Snail1.....	141
24.6.La represión de Nr2f6 controla la diferenciación adipogénica.....	143
24.7.La sobreexpresión de Nr2f6 promueve la adipogénesis.....	145
24.8.Snail1 regula los niveles de IL-17 a través del control directo de Nr2f6.. ...	147
<b>Discusión .....</b>	<b>151</b>
25. Caracterización de autoantígenos en cáncer colorrectal.....	153
26. Papel de Snail1 en la diferenciación de fibroblastos y adipogenesis. ....	159
<b>Conclusiones .....</b>	<b>165</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>169</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>189</b>



## **ABREVIATURAS**



<b>AAT</b>	Antígeno asociado a tumor
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CAF</b>	Fibroblastos asociados a cáncer
<b>CCR</b>	Cáncer colorrectal
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DMEM</b>	Medio esencial Dulbecco modificado
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Kda</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida - espectrometría de masas tandem
<b>MMR</b>	Mismatch repair
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MSC</b>	Célula madre mesenquimal
<b>MSI</b>	Inestabilidad de microsatélites
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de acrilamida con Dodecil sulfato sódico
<b>SILAC</b>	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>TMA</b>	Micromatriz de tejidos

<b>TMT</b>	Tandem mass tag
<b>TNM</b>	Tumor, Nódulos, Metástasis
<b>WB</b>	Western Blot

## **INTRODUCCIÓN**





### 1. **Cáncer colorrectal**

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más frecuente en el mundo (1). La incidencia anual es de aproximadamente 1.2 millones de personas, principalmente en países de Europa occidental, Oceanía y Norte América. Los países africanos y asiáticos presentan una incidencia más baja, pero la occidentalización de su estilo de vida y dieta está produciendo un aumento significativo de nuevos casos. A nivel mundial, se estima que produce 600.000 muertes al año, ocupando el cuarto puesto de muertes relacionadas con cáncer (1). En España, el cáncer colorrectal es el cáncer más frecuente con 32.240 nuevos casos en 2012. En ese mismo año el número de fallecimientos fue de 14.700 personas en España, situándolo como el segundo cáncer tras el de pulmón con mayor mortalidad (2).

Los pacientes en estadios tempranos del CCR normalmente no presentan ningún tipo de síntoma. La sintomatología se debe al crecimiento del tumor primario hacia el lumen o estructuras adyacentes, produciéndose en estadios avanzados de la enfermedad. Los niveles de supervivencia tras el diagnóstico de CCR avanzado no supera el 6%-10%. Esta alta mortalidad se debe a la metástasis del tumor primario a otros órganos, principalmente hígado y pulmón, donde la cirugía no es suficiente y el tratamiento se basa en la quimioterapia.

Por todo ello, las investigaciones actuales en cáncer colorrectal se centran en desarrollar nuevas técnicas de detección molecular, identificar nuevos biomarcadores que permitan un cribado de la enfermedad en sus estadios más tempranos, y en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que permitan una quimioterapia más eficaz en cualquier estadio de la enfermedad. Para conseguir estos objetivos es necesario un conocimiento en profundidad de los distintos factores y etapas que afectan al desarrollo del tumor primario, al microambiente tumoral y al proceso metastásico.

#### 1.1. **Desarrollo y etiología del cáncer colorrectal**

El cáncer colorrectal es una enfermedad heterogénea que puede producirse a partir de diferentes antecedentes patológicos (3, 4). En la mayoría de los casos, el CCR es esporádico (aproximadamente entre el 70%-90%) y la aparición del tumor se debe a complejas interacciones entre el individuo y factores ambientales (Figura 1). Estudios epidemiológicos muestran una asociación directa entre la presencia de CCR y una dieta rica en carnes rojas y pobre en fibra (5, 6). El tabaquismo muestra una relación directa con la aparición y la mortalidad de CCR a partir de los meta-análisis realizados de múltiples estudios que muestran

el incremento de CCR en la población fumadora con respecto a las personas que nunca han fumado (7). Además, se ha asociado el tabaquismo con el incremento de la aparición de diferentes tipos de pólipos como el pólipo adenomatoso o el serrado (8, 9)

Otros factores que influyen en el posible desarrollo de CCR son la edad o la presencia de inflamaciones sistémicas. Durante los últimos años se han estudiado estos factores ambientales pero todavía no existen estudios concluyentes al respecto. En el 10%-30% de los casos de CCR diagnosticados sí existe una correlación directa con la presencia de distintas alteraciones genéticas específicas y hereditarias que se agrupan en diferentes síndromes (10) (Figura 1).

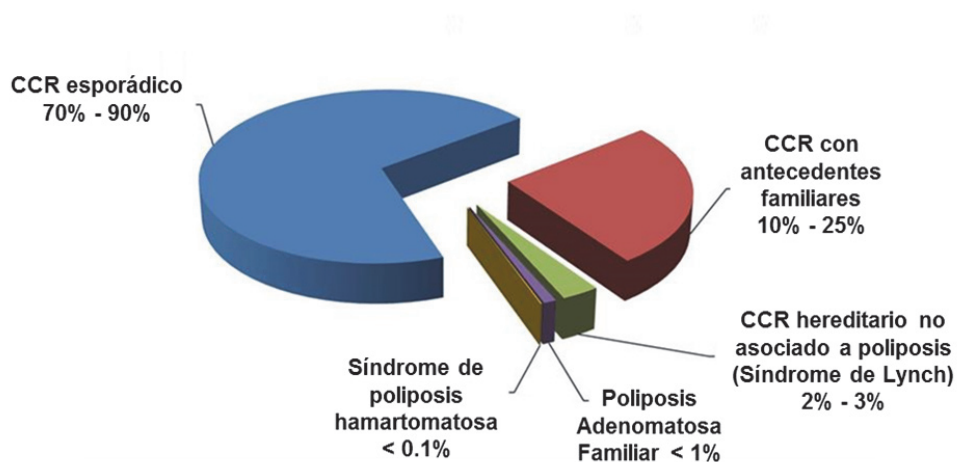


Figura 1. Etiología del cáncer colorrectal (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).

### 1.1.1. CCR con antecedentes familiares

Un alto porcentaje de los casos de CCR diagnosticados corresponden a pacientes que presentan antecedentes familiares de CCR o pólipos adenomatosos (11). Se ha descrito que los individuos cuyos familiares de primer grado (padres e hijos) con pólipos adenomatosos presentan un alto riesgo de presencia de adenoma o CCR (12). En estos casos no se ha descrito la alteración genética hereditaria como en el resto de los síndromes. Por ello, en estos individuos se recomienda la realización de pruebas diagnósticas regulares como la colonoscopia a partir de los 40 años, para poder detectar y eliminar las lesiones antes del desarrollo de la enfermedad (13, 14).

### **1.1.2. CCR hereditario no asociado a poliposis (Síndrome de Lynch)**

El cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC) es una enfermedad dominante autosomal que predispone al desarrollo de diferentes tipos de tumores, especialmente el colorrectal (15, 16). Los pacientes con HNPCC presentan un diagnóstico temprano y un buen pronóstico de la enfermedad con una frecuencia en la población de 1:1000 (17). Las vías de señalización molecular que están alteradas en este tipo de CCR se deben a la presencia de mutaciones en la línea germinal de los genes que participan en el sistema de reparación del DNA (mismatch repair, MMR): MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 o PMS1 (18), lo que produce inestabilidad de microsatélites (MSI) (19).

### **1.1.3. Poliposis Adenomatosa Familiar**

La Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) es una enfermedad dominante autosomal caracterizada por el desarrollo de cientos de adenomas en el colon y en el recto a edades tempranas. Este desarrollo tumoral se debe principalmente a alteraciones en el gen supresor de tumores APC (adenomatous polyposis coli). Su alteración produce inestabilidad cromosómica y desarrollo de CCR (20).

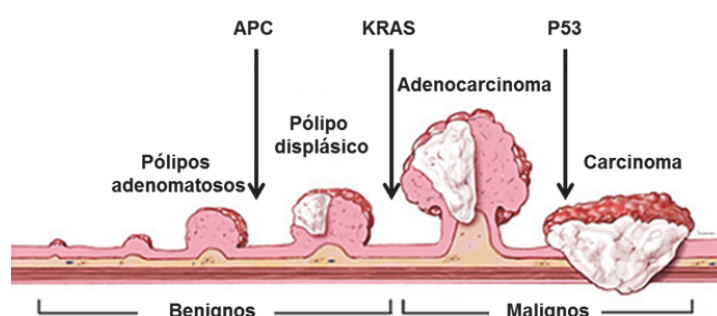
### **1.1.4. Síndrome de poliposis con estructura hamartomatosa**

Se han descrito diferentes síndromes que producen el desarrollo de múltiples pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal. La mayoría de estos síndromes son hereditarios autosomales dominantes en los que se incluyen el síndrome de poliposis juvenil (JPS), el síndrome Peutz-Jeghers (PJS) o el síndrome de poliposis mixto hereditario. La progresión de estos tipos de pólipos no se ha descrito en profundidad debido a que son mecanismos diferentes a la secuencia clásica adenoma-carcinoma. Los cambios histológicos que se observan en estos pacientes consisten en una completa desestructuración de la lámina propia que iniciaría el desarrollo de cáncer epitelial (21, 22).

### **1.1.5. Cáncer colorrectal esporádico**

La mayoría de los casos de cáncer colorrectal diagnosticados se deben a casos esporádicos en los que no existe ningún componente hereditario. En la década de los 80, el Dr. Bert Vogelstein propuso un modelo de carcinogénesis colorrectal donde una serie de alteraciones conllevaba la transformación de una lesión benigna en adenoma y finalmente en

un adenocarcinoma colorrectal (la secuencia adenoma-carcinoma) (23). La transición de un epitelio normal a un tumor maligno está asociado a eventos moleculares específicos que incluyen alteraciones en el número de cromosomas (aneuploidía) y alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores como KRAS o p53 (24-27). En los primeros eventos de esta vía de señalización aparece la delección del gen APC, que se produce en aproximadamente el 60% de las neoplasias colorrectales. Las mutaciones en los oncogenes KRAS conllevan un aumento en el crecimiento y la progresión del adenoma hacia adenocarcinoma que se completa finalmente con la inactivación o mutación en p53 (Figura 2).



**Figura 2. Secuencia adenoma – carcinoma propuesto por Vogelstein (John Hopkins Medicine).**

Hoy en día, este modelo se considera demasiado esquemático y diferentes estudios sugieren que la carcinogénesis es un proceso extremadamente complejo con múltiples alteraciones genéticas adicionales en un gran número de oncogenes y genes supresores de tumores (28). La investigación actual se dirige a la identificación de los perfiles de alteraciones genéticas individuales que determinen el tipo de patología y el tratamiento de los casos esporádicos de CCR.

Se han descrito tres mecanismos moleculares consecuencia de mutaciones somáticas previas que conducen a la malignización de la mucosa colorrectal: la inestabilidad cromosomal, la inestabilidad de microsatélites y el fenotipo hipermetilador de las islas CpG. Cada uno de estos mecanismos presenta diferentes alteraciones moleculares (29).

### **a. Inestabilidad cromosomal**

La inestabilidad cromosómica es la ganancia o pérdida de cromosomas enteros o partes de ellos y se detecta en aproximadamente el 85% de los CCR (30). Entre los mecanismos que producen la inestabilidad cromosomal se encuentran alteraciones en los genes que participan en las interacciones entre el huso y el cinetocoro durante la mitosis, la condensación de los

cromosomas, la cohesión de las cromátidas hermanas y la regulación de los puntos de control del ciclo celular (25, 31). La citogenética convencional y los estudios de hibridación genómica comparativa (CGH) en CCR muestran la frecuente aparición de aberraciones cromosómicas como el aumento de 20q, 13q, 7p y 8q y la pérdida de 18q, 17p y 8p (162, 13, 148, 48, 112). La región más común de pérdida alélica (75% de los CCR) está en el cromosoma 17p que contiene el gen supresor TP53 (24).

### **b. Inestabilidad de microsatélites (MSI)**

Los microsatélites son secuencias de DNA cortas de entre 1–6 pares de bases de longitud repetidas y distribuidas a lo largo del genoma humano. La MSI, es un tipo de inestabilidad genómica asociada a defectos en los procesos de reparación de DNA (DNA mismatch repairs, MMR), que producen alteraciones en la replicación del DNA y causan la aparición de inserciones y deleciones en los microsatélites. Estos defectos genéticos se describieron por primera vez en la década de los 90 y se han relacionado ampliamente con la patogénesis del cáncer. En la mayoría de los casos de cáncer colorrectal HNPCC se observa MSI, pero también aparecen en torno a un 20% en casos de cáncer colorrectal esporádico (32, 33).

Actualmente, se han identificado más de 30 mutaciones genéticas en tumores con alteraciones en el sistema MMR relacionadas con diversas funciones celulares como la reparación del DNA (MRE11A), receptores de factores de crecimiento (IGF receptor II) o factores pro-apoptóticos (BAX). Otra característica notable de los tumores tipo MSI es la baja frecuencia de mutaciones en KRAS o PI3K, cuyas alteraciones son muy prevalentes en la carcinogénesis colorrectal (34).

Desde el punto de vista clínico, los tumores MSI se diagnostican fácilmente en fases tempranas. Además, son tumores poco diferenciados y presentan necrosis tumoral y una fuerte infiltración de células inflamatorias (35).

### **c. Fenotipo hipermetilador de islas CpG**

Las lesiones precursoras que conducen al desarrollo de carcinomas por esta vía son denominadas pólipos serrados. Estas lesiones incluyen la presencia de criptas intestinales hiperplásicas aberrantes, adenomas serrados y pólipos hiperplásicos. Estos tumores presentan un alto índice de hipermetilación en el DNA que lleva a la inactivación de la función de los genes supresores de tumores (36, 37). Los tumores de CCR muestran hipermetilación en

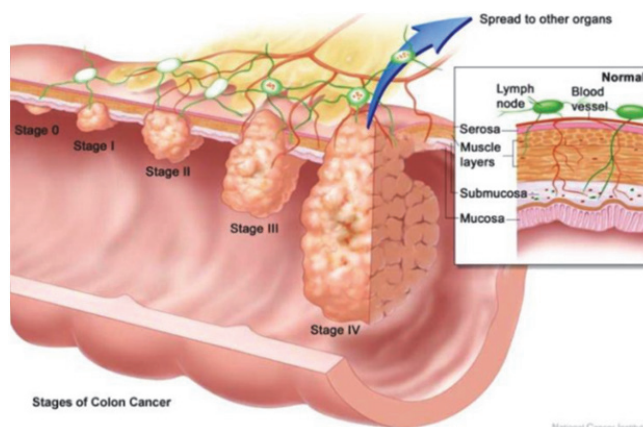
zonas concretas de los promotores genéticos conocidos como islas CpG (CIMP+) (38). Igual que los tumores resultantes de la inestabilidad cromosómica, los tumores CIMP+ muestran una serie de características clínico-patológicas bien definidas como una pobre diferenciación o una alta frecuencia de mutaciones en BRAF (39, 40). En cambio no presentan alteraciones clásicas en p53 o APC.

## 2. Aparición y clasificación del cáncer colorrectal

Los síntomas más comunes asociados a CCR son: dolor abdominal, sangrado rectal, alteraciones en la motilidad intestinal y pérdida involuntaria de peso (41). La presencia de estos síntomas varía según la localización del tumor. Por ejemplo, en tumores proximales es rara la presencia de sangrado rectal porque la sangre se mezcla con las heces a lo largo del tránsito colónico y desaparece. Esta sangre oculta en heces puede detectarse por una anemia ferropénica en los pacientes (42). Por otro lado, los tumores localizados en la zona rectal presentan importante sangrado y dolor pélvico (43). En pocos casos, los pacientes son asintomáticos y se identifican por obstrucción intestinal, fistulación o perforación de la pared intestinal (43).

El estadiaje o clasificación del CCR cuantifica la extensión de la enfermedad y aporta la información necesaria para iniciar el tratamiento apropiado. Aunque existen diferentes sistemas de clasificación, el más aceptado a nivel internacional es el sistema TNM (Tumor Nódulo Metástasis), introducido por el comité de legislación americano en cáncer (AJCC) y la unión internacional contra el cáncer (UICC). Este sistema de clasificación tiene tres componentes: tumor primario (T), nódulos linfáticos proximales afectados (N) y la presencia de metástasis en otros tejidos (M). Éstos, se combinan para formar diferentes grupos de estadiaje (Figura 3).

El sistema inicial de estadiaje de CCR fue el sistema de clasificación de Dukes. Este sistema lo propuso el Dr. Cuthbert Dukes en 1937 para la clasificación de cáncer rectal (44), y se modificó posteriormente para incluir los tumores colorrectales y la inclusión de un estadio "D" para indicar la presencia de metástasis distal. Este sistema clasifica a los tumores en función de la profundidad de la invasión en la pared intestinal y la presencia o ausencia de nódulos linfáticos afectados o metástasis distal. El estadio A indica que la lesión está localizada en la mucosa o submucosa colorrectal. En el B1, el tumor presenta extensión a la capa muscular y en el B2 el tumor penetra la capa muscular. En el estadio Dukes C se ha producido infiltración tumoral en los nódulos linfáticos bien sin infiltración de la pared intestinal (C1) o con penetración de la pared intestinal (C2). El estadio D indica la presencia de metástasis distales. En la Tabla 1 se muestra una comparación entre ambos sistemas de clasificación.



**Figura 3. Progresión tumoral del CCR y su correspondencia con el Sistema de estadiaje TNM (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).**

Aunque ambos sistemas aportan información útil para el pronóstico de la enfermedad, presentan diversos problemas dado que hay información que se debe obtener mediante cirugía (número de nódulos afectados en el paciente).

**Tabla 1. Comparativa entre la clasificación TNM y Duke's**

<u>Clasificación</u>				<u>Clasificación</u>
<u>TNM</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>Dukes</u>
0	T0	N0	M0	-
I	T1	N0	M0	A
II	T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B1
IIB	T4	N0	M0	B2
IIIA	T1 - 2	N1	M0	C1
IIIB	T3 - 4	N1	M0	C2
IIIC	Cualquier T	N2	M0	C2
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	D

### 3. Diagnóstico del cáncer colorrectal

Según la aparición de los síntomas se van a realizar diferentes abordajes para el diagnóstico clínico. Por ejemplo, si un paciente presenta síntomas graves y peritonitis, el diagnóstico se puede producir durante la intervención quirúrgica. Sin embargo como la mayoría



de los pólipos y cánceres tempranos no muestran ningún síntoma, las técnicas más habituales para su detección son las siguientes:

### **3.1. Diagnóstico por imagen y endoscopia**

La colonoscopia es la prueba más importante para la investigación y diagnóstico del CCR debido a que se visualiza directamente la mucosa del colon y del recto. Ofrece la posibilidad de tomar biopsias para su evaluación histológica, gracias a lo cual es capaz de detectar lesiones benignas, adenomas y/o tumores malignos. Entre las principales desventajas de esta técnica se encuentra su alta invasividad que puede suponer un aumento del riesgo de complicaciones, el elevado coste económico para el sistema sanitario y la poca adherencia a esta técnica entre los pacientes (45). La recto-sigmoidoscopia es una técnica endoscópica más sencilla que nos permite evaluar el colon distal y el recto, la cual es efectiva para el diagnóstico de la mayoría de los tumores colorrectales (46). Para aquellos pacientes en los que las técnicas endoscópicas no se recomiendan por edad u otras características, se puede realizar una colonoscopia virtual (también llamada colonografía tomográfica computarizada). Este método diagnóstico genera una reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de rayos X tomadas alrededor de un eje de rotación. La prueba de doble contraste con enema de bario es una técnica radiológica para valorar fundamentalmente el colon izquierdo que en la actualidad apenas se utiliza para el diagnóstico de CCR debido al desarrollo de las técnicas anteriormente descritas.

### **3.2. Pruebas diagnósticas: FOBT**

La prueba de sangre oculta en heces (FOBT) presenta la ventaja de ser simple y económica. Este método detecta la presencia de hemoglobina en el tracto gastrointestinal. Actualmente, están disponibles comercialmente dos tipos de FOBT. El guaiac FOBT que utiliza el producto químico guaiac para detectar la hemoglobina de la sangre y el FOBT inmunoquímico, que es más sensible porque utiliza anticuerpos contra la proteína hemoglobina humana (47). Estudios comparativos muestran que la precisión del FOBT inmunoquímico es superior al guaiac para la detección de CCR, siendo este test el recomendado en la actualidad para la detección de sangre oculta en heces en los estudios de cribado (48, 49). En ensayos clínicos aleatorios, el FOBT inmunoquímico ha mostrado la misma capacidad de detección de CCR que la colonoscopia (50, 51). Sin embargo, la FOBT presenta una baja sensibilidad, especialmente en estadios tempranos y una alta tasa de falsos positivos (es decir un falso

resultado positivo cuando en realidad no hay ninguna lesión que lo justifique) que requiere, si la prueba es positiva, el uso de un método invasivo como la colonoscopia para determinar si el paciente tiene CCR.

### **3.3. Diagnóstico molecular. Uso de biomarcadores**

Los biomarcadores son indicadores específicos de los estados biológicos y/o patológicos y pueden utilizarse no sólo para el diagnóstico, sino también para la clasificación de los pacientes y para predecir o monitorizar la respuesta a un tratamiento. Actualmente, existen pocas proteínas como biomarcadores de CCR, entre ellas destacan el CEA (antígeno carcinoembrionario) y el CA19.9 (52). El problema de estos biomarcadores es que su capacidad diagnóstica es baja para detectar CCR debido a que existen un amplio número de enfermedades inflamatorias que producen un aumento de sus niveles. Además, presentan una baja sensibilidad para la detección de estadios tempranos (53). Entre las enfermedades que producen un aumento en los niveles de CEA se encuentran la gastritis, enfermedad hepática, diverticulitis y cualquier estadio inflamatorio crónico o agudo. La sociedad americana de clínica oncológica (ASCO) y el Grupo Europeo de marcadores tumorales recomiendan que ni los niveles en suero de CEA ni de CA 19-9 se utilicen para realizar el cribado de CCR (54). Sin embargo, los niveles de CEA en suero sí son útiles para el pronóstico de pacientes a los que se les ha diagnosticado CCR porque los pacientes con niveles de CEA superiores a 5 ng/ml presentan un peor pronóstico (independientemente del estadio del CCR). Además, la ASCO recomienda el seguimiento de los niveles de CEA en el pre y post-operatorio, ya que es un marcador de recidiva después de la cirugía (55).

## **4. Biomarcadores en CCR**

Actualmente, las tecnologías “ómicas” permiten identificar, cuantificar y caracterizar miles de genes o proteínas en muestras biológicas complejas. Ello ha hecho posible el estudio a nivel global de las características de un tumor y ha permitido un gran avance en el descubrimiento de nuevos marcadores asociados a cáncer y al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Los biomarcadores se clasifican generalmente en dos grupos: biomarcadores genéticos y proteómicos.

### 4.1. Biomarcadores genéticos

Desde la década de los 90, el desarrollo de la tecnología de los microarrays de DNA ha permitido pasar del estudio de un gen individual al estudio simultáneo de miles de genes (56). Comparando los perfiles de expresión de una muestra normal frente a una tumoral se pueden definir patrones de expresión génica propios de un determinado tipo de cáncer. Utilizando los microarrays de DNA se han caracterizado varios tipos de cáncer como el de mama (57), próstata (58), vejiga (59) o melanoma (60), entre otros, permitiendo caracterizar los genes que se expresan de forma anómala en dichos tumores. Hasta hoy, sólo los estudios de perfiles de expresión génica en cáncer de mama han demostrado ser clínicamente útiles (61).

En cáncer colorrectal destacan dos estudios publicados en el año 2013 que clasifican el CCR en diferentes subtipos en función de sus patrones de expresión génica y las respuestas a terapias específicas (62-64). A pesar de las diferencias en el enfoque y clasificación de los subtipos de CCR, ambos estudios son capaces de clasificar el CCR con un pequeño número de genes, y podrían ser extrapolables a la rutina clínica.

### 4.2. Biomarcadores proteómicos

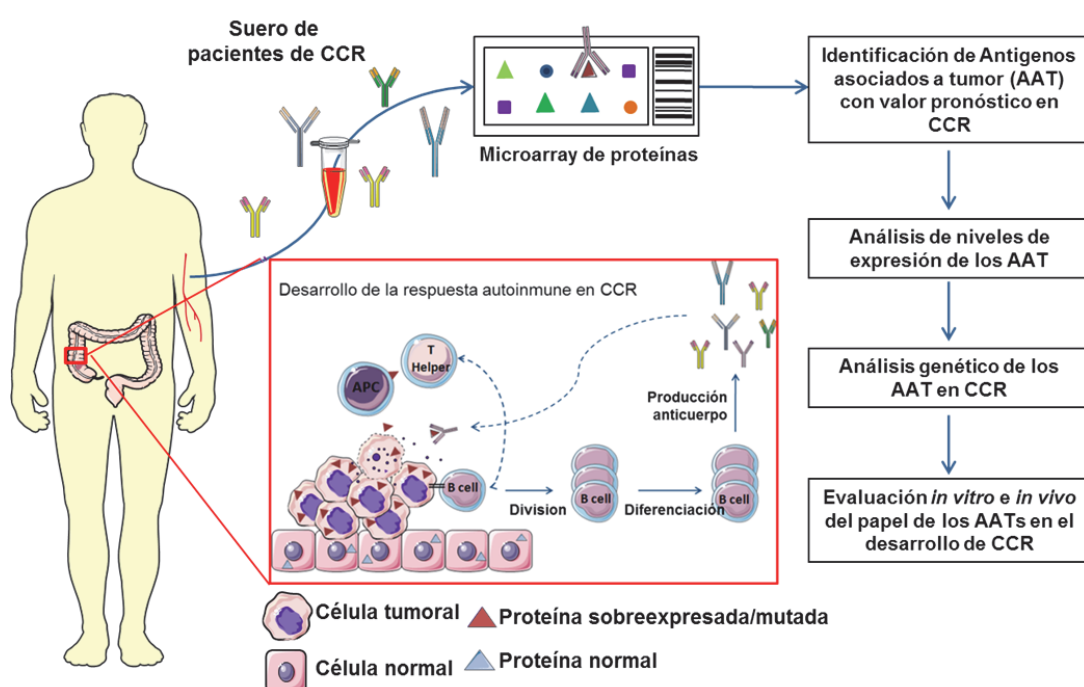
Las proteínas que presentan modificaciones en sus niveles de expresión durante la progresión del cáncer son buenas dianas para su diagnóstico y tratamiento. El desarrollo de la proteómica ha permitido identificar tanto proteínas cuya abundancia está relacionada con la progresión tumoral, como modificaciones postraduccionales presentes en las proteínas de las células y los tejidos que son determinantes a la hora de otorgar un fenotipo tumoral a la célula.

Para la búsqueda de nuevos biomarcadores en CCR existen, al menos dos aproximaciones diferentes: el estudio de la expresión diferencial de las proteínas en las células o tejidos mediante espectrometría de masas y el estudio de la respuesta humoral del organismo frente a proteínas tumorales.

#### 4.2.1. Respuesta humoral en cáncer y autoanticuerpos como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico

Los pacientes con cáncer pueden desarrollar una respuesta humoral debido a la presencia en el tumor de proteínas que están sobreexpresadas, mutadas, mal plegadas, en localizaciones subcelulares erróneas o degradadas de manera aberrante (65, 66), produciendo autoanticuerpos frente a ellas (67) (Figura 4). Estas proteínas se denominan antígenos

asociados a tumor (AATs) y los anticuerpos que se producen frente a estos AATs son biomarcadores de cáncer de gran calidad porque son muy estables y su presencia en el suero se produce en la fase asintomática del cáncer (68). La mayoría de los autoanticuerpos en el suero de pacientes con cáncer reconocen proteínas alteradas asociadas a procesos de carcinogénesis como el ciclo celular, transducción de señales, proliferación o apoptosis. Por ello, la identificación y caracterización de estas moléculas ayudaría a describir eventos moleculares asociados al proceso de la carcinogénesis. La “inmunómica” del cáncer es un área importante de investigación y se ha utilizado para identificar biomarcadores potenciales en distintos tipos de cáncer (69-71).



**Figura 4. Desarrollo de la respuesta humoral en pacientes de CCR.** El desarrollo tumoral va a producir alteraciones en las proteínas que van a permitir la producción de una respuesta autoinmune que participa en impedir la progresión tumoral. La producción de autoanticuerpos puede ser detectada por técnicas de inmunodetección como ELISA o el uso de *microarrays* de proteínas que van a permitir la identificación de firmas de AAT específicas de cada tumor, siendo útiles para el diagnóstico y pronóstico en cáncer (adaptado de Invitrogen).

Para la identificación de los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes de CCR se recurre al uso de microarrays de proteínas y donde los AATs están inmovilizados. La detección de esta interacción permite la identificación de los autoanticuerpos y de sus proteínas reactivas respectivas como biomarcadores potenciales de la enfermedad. Los microarrays de proteínas recombinantes humanas de alta densidad pueden contener hasta 9000 proteínas humanas expresadas en células de insecto Sf9 (ProtoArrays™, Invitrogen). Las proteínas impresas en el microarray se conocen *a priori* lo que hace que la identificación de los AATs sea

más sencilla. Sin embargo, el alto coste de estos microarrays provoca que normalmente se utilicen pocas muestras y la validación se realice mediante otras pruebas ortogonales, como el ELISA, donde se puede aumentar significativamente el número de muestras analizadas.

### 4.2.2. Antígenos asociados a cáncer colorrectal

Nuestro grupo identificó y caracterizó en 2009 la respuesta humoral a CCR mediante cribado con *microarrays* comerciales de proteínas, describiendo un total de 43 antígenos asociados a tumor (AAT). Los autoanticuerpos contra 6 AAT (PIM1, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, SRC y ACVR2B) demostraron ser buenos marcadores de diagnóstico temprano para cáncer colorrectal (72, 73). Además, se encontró que la combinación de cuatro AAT (FGFR4, PIM1, MAPKAPK3 y ACVR2B) junto con péptidos de los TAAs GTF2i, NHSL1 y SREBF2 desplegados en fagos (74), permitía discriminar sueros de pacientes con CCR frente a sueros control con gran especificidad y sensibilidad (72). Por otra parte, los TAAs identificados eran en su mayor parte quinasas por lo que podrían ser potenciales dianas terapéuticas en CCR, por su participación en procesos de regulación de la transcripción, el crecimiento celular o la diferenciación.

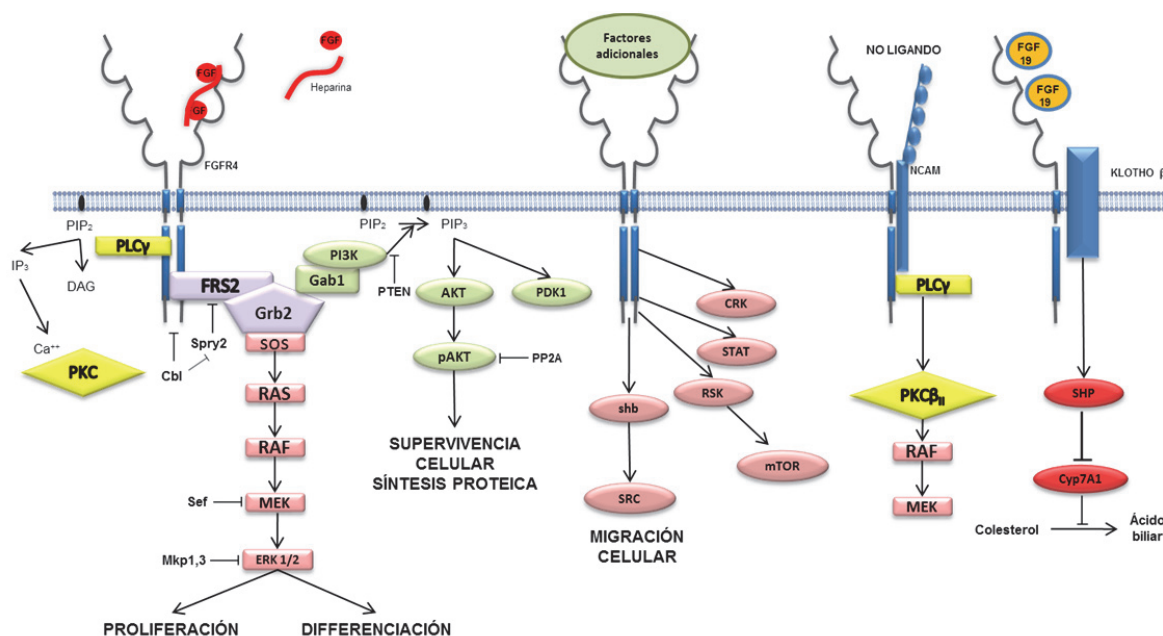
Entre los antígenos más inmunorreactivos a los autoanticuerpos de pacientes se encontraron las quinasas FGFR4 y PIM1 (72). En los trabajos previos de caracterización de estos antígenos realizados en nuestro grupo se evaluó su capacidad inmunogénica, pero no las posibles causas de su inmunogenicidad (i.e. sobreexpresión, mutación, degradación aberrante, hiperactivación, glicosilación aberrante...), o su implicación en el desarrollo tumoral de CCR (75).

#### 4.2.2.1. FGFR4 (Receptor del factor de crecimiento de fibroblasto 4)

FGFR4 es un receptor de membrana de 120 kDa, con tres dominios inmunoglobulina extracelulares, una región transmembrana con 26 aminoácidos y un dominio intracelular con actividad tirosín quinasa (76). FGFR4 presenta además una segunda isoforma que es secretada sin dominio intracelular ni transmembrana.

FGFR4 se encuentra en la membrana plasmática, pero también puede internalizarse formando complejos con sus ligandos y desarrollar su función directamente en el citosol o en el núcleo. FGFR4 juega un papel en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y migración. Cuando se une a sus ligandos en la superficie celular se produce la dimerización del receptor, lo que provoca su auto-fosforilación y la iniciación de la transducción de señal (Figura

5). El ligando principal de FGFR4 es FGF19, aunque existen evidencias de que no siempre es necesaria la presencia de un ligando de la familia FGF para que se produzca la señalización por FGFR4. Por ejemplo, en presencia de heparina (77) o formando complejos con NCAM (78). Un regulador clave en la vía de señalización de FGFR4 es el co-receptor  $\beta$ -Kloto (KLB), una proteína transmembrana de 130 kDa que presenta un perfil de expresión más restrictivo, limitándose a tejido adiposo, páncreas e hígado. KLB y FGFR4 se encuentran en altos niveles en hepatocitos maduros, donde KLB estabiliza la unión de FGF19 a FGFR4 para regular la producción del colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) y por tanto la producción de ácido biliar (79).



**Figura 5. Señalización de FGFR4 en proliferación, supervivencia y migración celular relacionadas con cáncer.** La señalización de FGFR4 depende tanto de la homo- o hetero-dimerización del receptor, como de los distintos ligandos que se unen a su dominio extracelular. Las diferentes activaciones del receptor pueden producir la señalización a través de distintas vías que implican diferentes quinasas como ERK, AKT o SRC asociadas a distintas funciones celulares, o la activación de rutas de síntesis como la del ácido biliar en el hígado (76).

Por otra parte, FGFR4 forma complejos con MT1-MMP, donde MT1-MMP y FGFR4 son regulados de maneras opuestas en la progresión tumoral dependiendo de la presencia del polimorfismo rs351855 que produce el cambio de la glicina 388 por una arginina (80). Este polimorfismo es capaz de potenciar la estabilización del receptor e inducir la fosforilación de MT1-MMP aumentando su actividad (81).

FGFR4 no es esencial ni durante la embriogénesis ni en el individuo adulto (82) aunque participa en varias rutas relacionadas con la homeostasis energética como la regulación de la

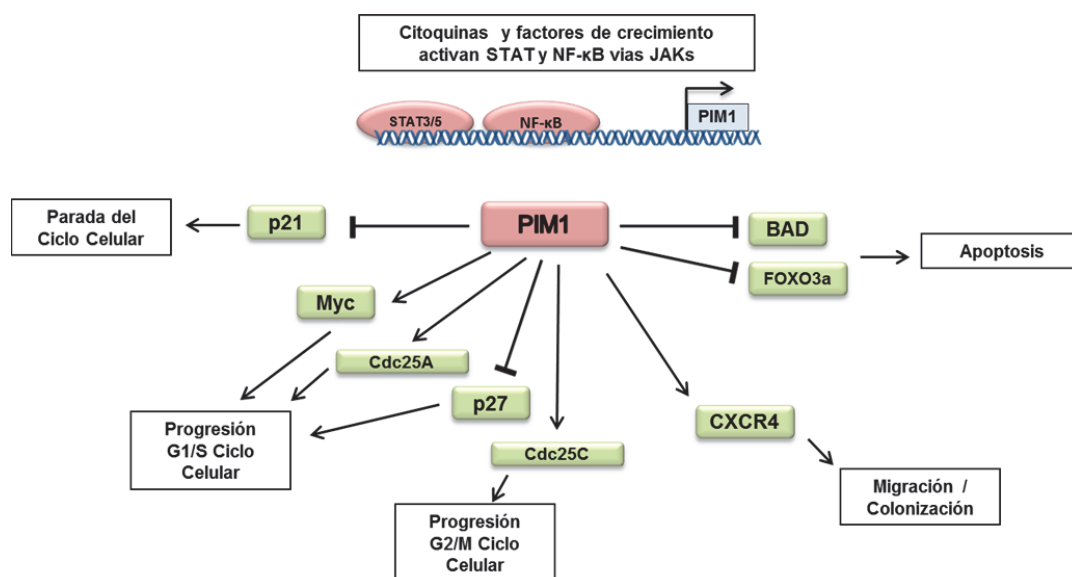
glucosa y los niveles de triglicéridos en plasma (83, 84). Se ha descrito su expresión en un gran número de tejidos. En patologías neoplásicas como rabdomiosarcoma, FGFR4 se encuentra sobreexpresado y se ha asociado a una menor supervivencia (75). Además, en rabdomiosarcoma se han encontrado mutaciones puntuales activadoras de la actividad de FGFR4 que luego se han descrito en otros tumores, como en cáncer de mama (85).

#### 4.2.2.2. PIM1 (Protooncogén serín treonín quinasa 1)

PIM1 es el miembro más estudiado de la familia PIM (proviral insertion site in Moloney murine leukemia virus) compuesta por tres miembros (PIM1, PIM2 y PIM3). Estas serín treonín quinasas se encuentran muy conservadas en los organismos pluricelulares. PIM1 presenta dos isoformas, una de 34 kDa y otra de 44 kDa, debido a que la traducción del mRNA se puede iniciar por un sitio alternativo al ATG (86). Ambas isoformas presentan una actividad quinasa *in vitro* muy similar. La principal diferencia radica en la presencia en la isoforma de 44 kDa de un dominio rico en prolina en el amino terminal capaz de unirse a dominios SH3 del receptor tirosín quinasa ETK, por lo que podría encontrarse anclado a membrana (87).

La expresión génica de PIM1 aumenta por la acción de citoquinas, factores de crecimiento y algunas hormonas como por ejemplo G-CSF, GM-CSF, eritropoyetina, interleuquinas (como IL-2), interferones o prolactina (88). Estos factores actúan a través de la vías JAK/STAT, siendo los factores STAT3/5 y NF- $\kappa$ B los principales factores del aumento en los niveles de transcripción al unirse al promotor del gen de PIM1 (89-91). PIM1 es capaz de fosforilar y estabilizar las proteínas SOCS lo que produce una retroalimentación negativa de la vía JAK/STATs (92). La carencia de dominios regulatorios en la estructura de la proteína, permite que PIM1 se encuentre constitutivamente activa, por lo que su regulación (transcripción y traducción) se realiza principalmente a nivel del mRNA y la degradación proteosomal de la proteína (93). Además, se ha observado que la proteína regula su estabilidad mediante los niveles de fosforilación. PIM1 es capaz de autofosforilarse (94). Aunque la fosforilación por otras quinasas todavía no se conoce, sí se conoce su regulador negativo: la fosfatasa PP2A, que defosforila PIM1 y promueve su degradación (95). PIM1 es capaz de fosforilar a un gran grupo de sustratos y regular diferentes procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la división celular, los procesos de diferenciación y la apoptosis (Figura 6).





**Figura 6. Vías de señalización y sustratos relacionados con PIM1.** La activación de la expresión de PIM1 por diferentes vías de señalización o factores de transcripción van a permitir la fosforilación por PIM1 de distintas proteínas implicadas en procesos de ciclo celular como p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> o Myc. Además, juega un papel regulador importante debido a que su expresión es capaz de inhibir la apoptosis celular por inhibición o activación de miembros de la familia Bcl-2. También se ha relacionado a PIM1 con procesos de migración celular en leucemia.

PIM1 se expresa a altos niveles en tejidos hematopoyéticos y linfoides, como la médula ósea, el timo o el bazo (93), y en tejidos no hematopoyéticos como la glándula prostática o el hipocampo. La sobreexpresión de PIM1 se descubrió en leucemia mieloide humana de células T, y otros tipos de linfomas. Recientemente se ha descrito su sobreexpresión en distintos tumores sólidos como próstata, páncreas, liposarcoma o cáncer hepático (96-98). A nivel celular podemos detectar PIM1 tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Uno de los sustratos mejor descritos de PIM1 es p21<sup>WAF1</sup> (99). PIM1 fosforila al inhibidor CDK p21<sup>WAF1</sup> en su tirosina 145, promoviendo su transporte al núcleo e inactivando p21<sup>WAF1</sup>. La fosforilación del inhibidor CDK p27<sup>KIP1</sup> produce un incremento de su degradación proteosomal y la progresión del ciclo celular. PIM1 tiene también la capacidad de fosforilar Cdc25A y Cdc25C por lo que es capaz de inducir las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular, según los niveles de fosforilación de estas proteínas (100). PIM1 es capaz de participar en la regulación de procesos de migración en células de leucemia linfática crónica (LLC), debido a que participa en la estabilización en la membrana del receptor de quimioquinas CXCR4, cuando es fosforilado por PIM1. Además, se ha descrito que PIM1 regula la fosforilación de otros factores de transcripción como FoxO3a o BAD (101), actuando PIM1 como un factor de supervivencia oncológico que es capaz de bloquear la muerte por apoptosis de las células que lo sobreexpresan. Otro de los sustratos mejor estudiados de PIM1 es c-MYC. Así, PIM1



participa en el incremento en la actividad transcripcional de c-MYC, fosforilando c-MYC e incrementando su vida media (102). Finalmente, PIM1 también es capaz de fosforilar a 4E-BP1, el cual es capaz de inhibir eIF-4e uniéndose a él. Dado que eIF-4E es un factor limitante de la síntesis proteica, una de las posibles autorregulaciones de PIM1, consiste en regular su traducción dependiente de 5'-cap (98).

### 5. El microambiente tumoral

El microambiente tumoral es el lugar donde las células tumorales crecen y se desarrollan. Se trata de un ambiente complejo con zonas invasivas del tumor, células epiteliales tumorales, estroma, vasos sanguíneos, células inflamatorias infiltradas, matriz extracelular y fibroblastos (103) (Figura 7).

El microambiente tumoral representa una interfase dinámica entre el tumor y el tejido normal, donde se producen diferentes eventos moleculares que juegan un papel clave en la oncogénesis e invasión tumoral. Esto se debe a la presencia de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, que pueden activar a las células presentes en esta interfase (104-106). Los cambios que ocurren en el microambiente tumoral son similares a los que se producen en inflamaciones crónicas con secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  o IL-1 (107), claves en angiogénesis, proliferación celular o remodelación de la matriz extracelular, los cuales son eventos fundamentales en la progresión y desarrollo tumoral (108).

El principal componente del estroma tumoral son los fibroblastos, encargados de formar la estructura y sintetizar los componentes de la matriz extracelular, como colágenos o fibronectina. En condiciones normales los fibroblastos se mantienen en un estado quiescente y sólo se activan en procesos de cierre de herida o fibrosis, situaciones que requieren de una remodelación tisular (109, 110). Los fibroblastos activos secretan altos niveles de proteínas de matriz extracelular y proliferan más que los fibroblastos no activados. La activación de los fibroblastos puede deberse a diferentes estímulos como factores de crecimiento o citoquinas como TGF $\beta$ . El papel que juegan los fibroblastos activos en el estroma tumoral, también llamados fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), consiste en la participación directa como promotores del crecimiento y progresión tumoral. La participación de los CAFs en la transición epitelio-mesénquima (EMT) es un área activa de investigación.

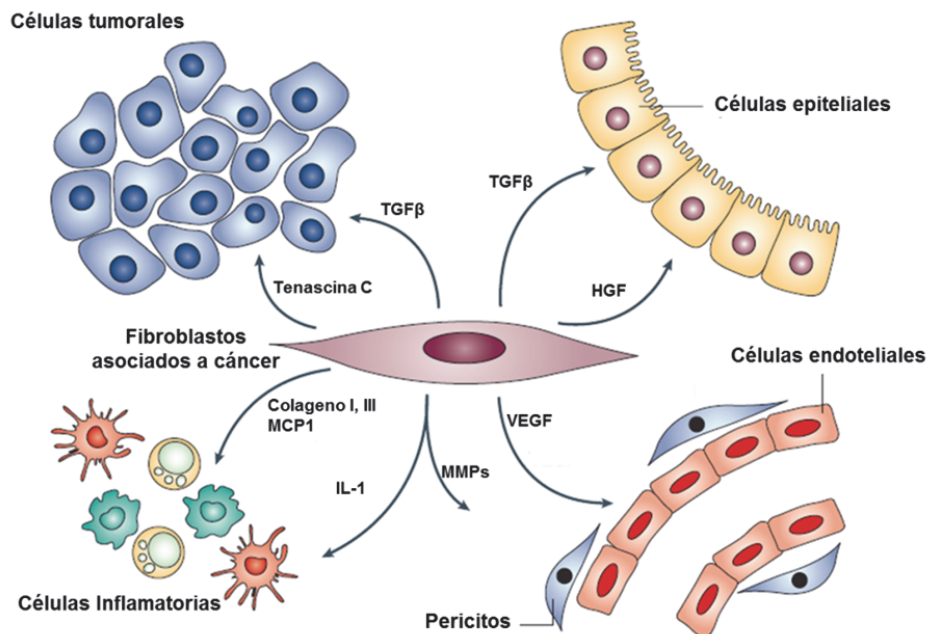


Figura 7. Representación esquemática del estroma tumoral y el papel central de los fibroblastos asociados a cáncer en la señalización sobre otros tipos celulares (103).

### 5.1. La transición epitelio mesénquima y Snail1

La EMT se considera como uno de los eventos claves en la evolución tumoral, facilitando la invasión y la metástasis. La EMT produce importantes cambios en la morfología y el comportamiento de las células epiteliales. La caracterización a nivel celular y molecular de la EMT nos permite destacar las tres características más importantes que suceden en este proceso (111, 112):

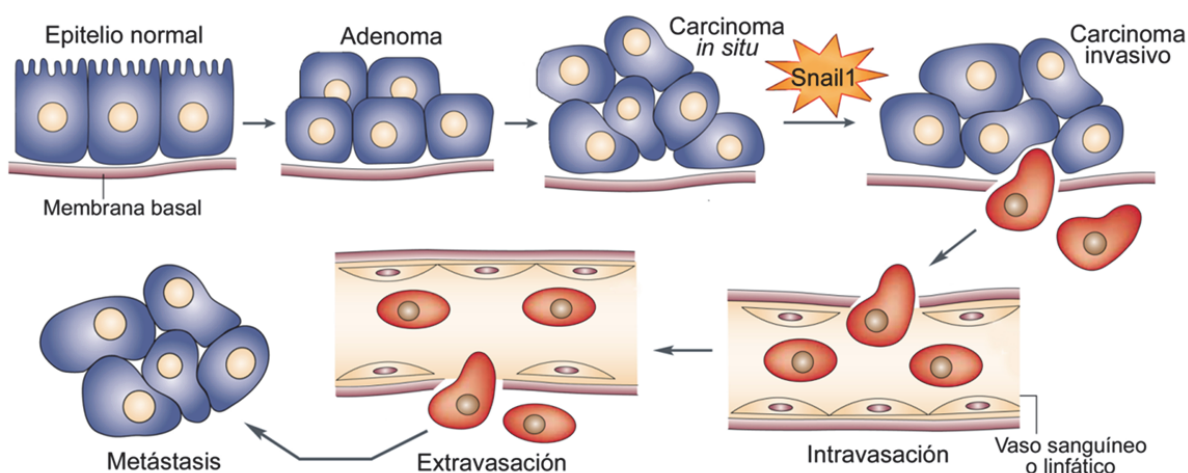
- Cambios morfológicos de las células epiteliales de polaridad apical-basal hacia células mesenquimales sin polaridad definida.
- Pérdida de expresión de proteínas implicadas en uniones célula-célula como E-cadherina, citoqueratinas y filamentos intermedios, y el aumento de la expresión de vimentina, fibronectina y algunas cadherinas de carácter mesenquimal.
- Cambios funcionales asociados a la conversión de una célula estacionaria o sésil a células móviles con capacidad de invadir la matriz extracelular.

Diferentes moléculas controlan el inicio y desarrollo de la transición epitelio-mesénquima en las células tumorales. Entre las moléculas que participan en la activación de la EMT, la más importante es el factor de crecimiento TGFβ, que a su vez induce la expresión de

Snail1 (113, 114). Snail1, a su vez, es el principal factor de transcripción que participa en el control de la expresión de los genes que producen los cambios fenotípicos asociados a la EMT.

Snail1 es una proteína de 264 aminoácidos en la que podemos definir dos dominios que interactúan íntimamente. El dominio carboxi terminal es responsable de la unión a la denominada caja E de DNA, con especificidad para la secuencia 5'-CANNTG-3'. En este carboxi terminal aparecen 4 dedos de zinc, encargados de mediar el reconocimiento de la caja E a los promotores de los genes que regula (115). En el amino terminal encontramos el dominio SNAG, que recluta proteínas encargadas de la remodelación de la cromatina como las histona-deacetilasas (HDAC), mSIN3 o el complejo represor del "polycomb" (116-118). Este dominio otorga el carácter de represor transcripcional a Snail1.

Snail1 reprime directamente una amplia variedad de genes, siendo el más importante el gen de la E-cadherina, clave para el cambio morfológico de la célula epitelial en la progresión tumoral (119). Además, también reprime otros genes que codifican para mucinas y citoqueratinas, proteínas de uniones estrechas como ocludinas y claudinas, y proteínas responsables de apoptosis y ciclo celular como p53, PTEN y ciclina D2 (120-122). Snail1, de manera directa o indirecta, es capaz de estimular la expresión de distintas proteínas como proteasas de matriz, el factor Wnt, Twist1, Zeb-1 o Lef y proteínas mesenquimales como vimentina o fibronectina (123).



**Figura 8. La transición epitelio-mesénquima en cáncer.** La iniciación de la EMT constituye en primer paso hacia el proceso metastásico, permitiendo la intravasación de las células tumorales. La transición mesénquima epitelio (MET) es el paso que va a permitir la extravasación del torrente sanguíneo o linfático al final del proceso metastásico y que permite la colonización de otros órganos(124).

Existen estudios previos que indican la relación entre algunos receptores de la familia de FGFR y este proceso principalmente en el desarrollo embrionario. El receptor FGFR1 es capaz de dirigir la transición epitelio-mesénquima en células del epiblasto durante el desarrollo

embrionario (125) y en el desarrollo de algunos tumores como el de próstata (126). FGFR2, presenta una isoforma con expresión en células epiteliales (FGFR2IIIb) y otra con expresión en células mesenquimales (FGFR2IIIc) (127). Además, se ha visto que se produce un cambio entre estas dos isoformas en células epiteliales de tumores de próstata (128, 129). Este cambio entre isoformas permite la expresión y estabilización de diferentes proteínas en la membrana celular, como el aumento de E-cadherina en células cancerosas epiteliales con características mesenquimales aumentando la capacidad metastásica.

La sobreexpresión de Snail produce un cambio de las células epiteliales hacia un fenotipo mesenquimal que va a permitir su extravasación a vasos sanguíneos y/o linfáticos, lo que constituye el primer paso hacia el proceso metastásico (Figura 8).

El estudio de Snail1 en carcinomas muestra que su distribución es limitada, restringiéndose prácticamente a las células estromales que se encuentran en el frente de avance del tumor. Estos resultados demuestran que Snail1 está presente en células mesenquimales activas y sugieren que tienen un papel importante en la comunicación entre el tumor y el estroma (130).

### **5.2. Snail1 y su participación en la diferenciación celular de fibroblastos tumorales**

Dentro del estroma tumoral, una de las principales fuentes de CAFs son las células madre mesenquimales (MSC). Se ha descrito que las MSC participan en la diferenciación hacia CAFs o la formación de vasos sanguíneos que irrigan al tumor (131). Las MSC presentes en el estroma pueden mantenerse en un estado quiescente, proliferar o diferenciarse hacia otros tipos celulares, siendo clave en la homeostasis y el desarrollo normal de los tejidos. Los mecanismos moleculares por los cuales las MSC son capaces de salir del ciclo celular y diferenciarse en distintas estirpes celulares como osteoblastos, adipocitos o miofibroblastos, no se conocen con exactitud. En la médula ósea, las MSC contribuyen a la regeneración de multitud de tejidos mesenquimales como hueso, cartílago, músculo, ligamentos, tendones, tejido adiposo y estroma (132-135). La mayoría de los tejidos adultos contienen poblaciones de células madre que son capaces de renovar el tejido después de un evento traumático, enfermedad o envejecimiento.

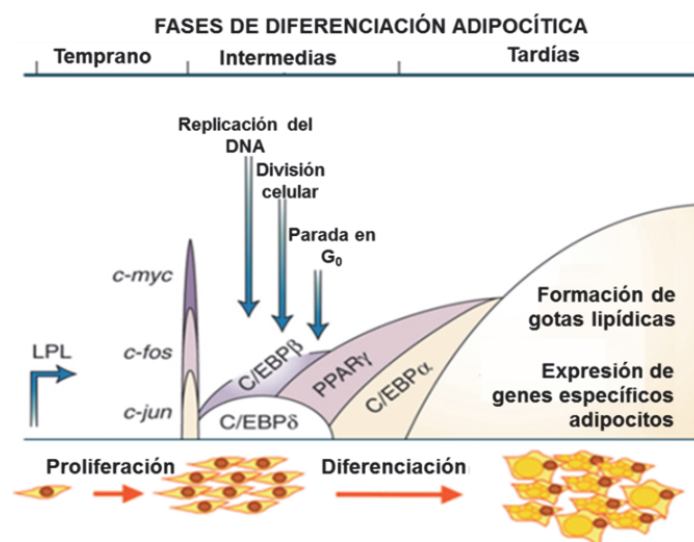
Recientemente, han aparecido diversos trabajos que estudian la sobreexpresión de Snail1 y como inhibe la diferenciación en células mesenquimales como las células 3T3-L1, C2C12 o MSC hacia otros tipos celulares como osteoblastos o adipocitos (136). Snail1 regula la diferenciación hacia osteoblastos a través de la represión de la expresión de distintas

proteínas como Runx2 y el receptor de la vitamina D (137). Los estudios publicados sobre la inhibición de la diferenciación adipocítica por Snail1 muestran cierta controversia sobre los mecanismos moleculares responsables de esta inhibición. Por un lado, se ha descrito que Snail1 induce la expresión de marcadores de fibroblastos activos como CD44 o S100A4 e inhibe la diferenciación mediante la activación de AKT (136). Por otro lado, se ha descrito la represión directa de Snail1 sobre los promotores de factores de transcripción claves en la diferenciación adipocítica como PPAR $\gamma$  (138). Además de la diferenciación, Snail1 controla las propiedades tumorigénicas de las células mesenquimales. El aumento de la expresión de Snail1 produce un aumento de los niveles de proliferación en fibroblastos (139). En las células mesenquimales la expresión de Snail1 induce la formación de sarcomas cuando se inyectan en ratones atímicos; además, el análisis inmunohistoquímico de sarcomas humanos como el leiomioma o el osteosarcoma muestra altos niveles de expresión para Snail1 (139). Este efecto es contrario al observado en células epiteliales donde Snail1 disminuye la proliferación (122), y podría explicar que la expresión de Snail1 en tumores epiteliales se localice en áreas estromales, donde se produce la invasión y la inflamación (130, 140).

Por otro lado, Snail1 es capaz de inhibir la diferenciación adipocítica (136). La adipogénesis se produce a través de una compleja cascada de factores de transcripción y moléculas señalizadoras celulares guiadas por la expresión de la familia de factores transcripcionales C/EBP (CCAAT/enhancer-binding) y PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) (141, 142). Ésta diferenciación es un proceso secuencial que se inicia con la inducción de C/EBP $\delta$  y C/EBP $\beta$  y, posteriormente, continúa con la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ . Estos dos últimos factores de transcripción son los encargados de inducir el programa final de la expresión génica que dirige la diferenciación adipocítica (Figura 9).

La adipogénesis juega un papel clave en el desarrollo del cáncer colorrectal por su participación directa en dos procesos: la obesidad y la caquexia. La obesidad es un factor de riesgo en los tumores más comunes (143-145). De hecho, existen numerosos estudios que relacionan la obesidad con el incremento del riesgo en la mortalidad y recidivas en cáncer, especialmente en cáncer de mama y próstata (146, 147). En CCR la obesidad parece estar asociado a un aumento en la mortalidad, sin embargo no existen estudios definitivos donde se haya demostrado esta relación como en otros tipos de tumores. El otro proceso donde la adipogénesis juega un papel clave es el llamado síndrome de la caquexia cancerosa. Se trata de un estado hipercatabólico caracterizado por la pérdida de peso y reducción tanto de la masa muscular como del tejido adiposo (148). Este síndrome está presente en más de dos terceras partes de los pacientes que mueren de cáncer y que puede ser la causa directa del 25% de los

fallecimientos (149, 150). Los cambios metabólicos producidos por este síndrome se relacionan principalmente a la aparición de citoquinas proinflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 o IL-1, pero todavía hoy en día se están definiendo los posibles mecanismos que llevan a la alteración de los tejidos musculares y adiposos (151-153).



**Figura 9. Expresión de los factores de transcripción durante la diferenciación adipocítica.** Tras la activación de la diferenciación adipocítica mediante diferentes estímulos hormonales, se inicia la fase temprana asociada al aumento en los niveles de proliferación celular. Posteriormente, se induce la expresión de factores de transcripción de la familia C/EBP y PPAR que dirigen la expresión de los genes específicos, encargados de los cambios fenotípicos característicos que conducen a la diferenciación final hacia adipocitos (154).

## 6. Proteómica y espectrometría de masas

La proteómica es un conjunto de metodologías cuyo objetivo fundamental consiste en la identificación del conjunto de proteínas (proteómica cualitativa), el análisis comparativo de los cambios en los niveles de expresión del conjunto de proteínas (proteómica cuantitativa), el análisis de los cambios químicos producidos en las proteínas modificando su actividad biológica (modificaciones post-traduccionales) y el análisis de las interacciones proteína-proteína.

La proteómica se basa en el análisis de proteínas de forma aislada, separándolas mediante técnicas de electroforesis monodimensional (1-DE) o bidimensional (2-DE) en geles de poliacrilamida o mediante isoelectroenfoque en solución (OFFGEL). Las muestras así fraccionadas se digieren posteriormente con tripsina u otras enzimas proteolíticas, los péptidos se separan por cromatografía y se analizan por espectrometría de masas (155). En la actualidad, el analizador de masas LTQ-Orbitrap es el más utilizado en espectrometría de

masas y el que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral. Consiste en un espectrómetro de masas híbrido formado por dos analizadores, una Trampa Iónica lineal modificada con doble detector, acoplada a un analizador de masas electrostático de alta resolución, denominado Orbitrap (Figura 10). En este analizador, los iones se inyectan tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga. Así los iones giran alrededor del electrodo central y se mueven adelante y atrás a través del eje del electrodo central. Los iones con una relación masa-carga específica se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central. La frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion e inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga, todo este cálculo se basa en la Transformada de Fourier (156). Actualmente, la identificación más común de proteínas se produce a través de la fragmentación de sus péptidos en una cámara de colisión CID (collision-induced dissociation). En CID, los péptidos ionizados se aceleran mediante un potencial eléctrico hacia niveles de alta energía cinética, y colisionan con las moléculas neutras de un gas (normalmente He, N o Ar) (157). El método CID produce generalmente la fragmentación del enlace peptídico, generando espectros MS/MS o MS<sup>2</sup>, que permiten identificar la secuencia peptídica a partir de la relación  $m/z$  de los diferentes fragmentos. Esta identificación se realiza normalmente de manera automática comparando los espectros teóricos generados en las bases de datos mediante motores de búsqueda como MASCOT o SEQUEST (158, 159). Además, el LTQ-Orbitrap incorpora una cámara de colisión adicional que se denomina HCD (high collision dissociation) que permite la obtención de fragmentos en la región baja del espectro (160). El HCD se puede definir como un CID de alta energía, en esta cámara los iones precursores tienen una energía cinética más alta y su activación es muy rápida. Se suele usar He como gas de colisión y los espectros de fragmentación generados suelen contener, además de los iones de las series convencionales, iones producidos por fragmentaciones múltiples. Este tipo de fragmentación nos va a permitir identificar los reporteros liberados en la fragmentación de los péptidos que se encuentran en la región de bajo  $m/z$  del espectro y se utilizan para la cuantificación de experimentos de proteómica cuantitativa con marcaje isobárico como veremos posteriormente.



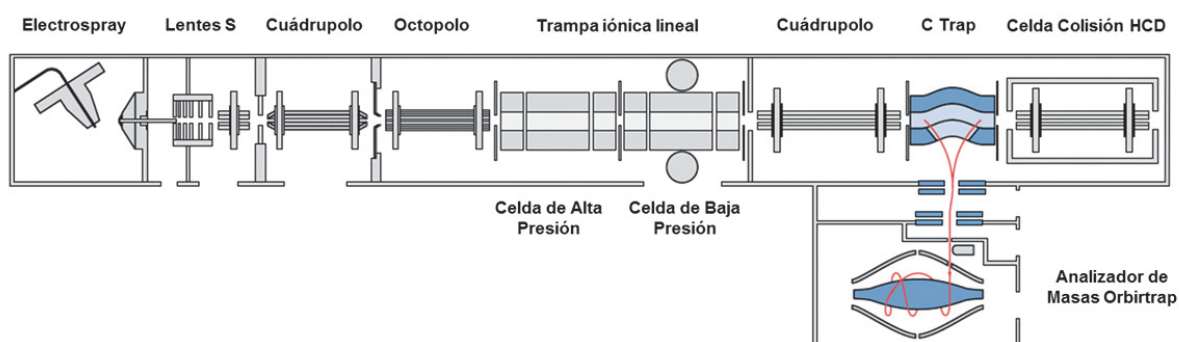


Figura 10. Esquema de la estructura del LTQ Orbitrap Velos (Adaptado de Thermo Scientific).

### 6.1. Proteómica cuantitativa

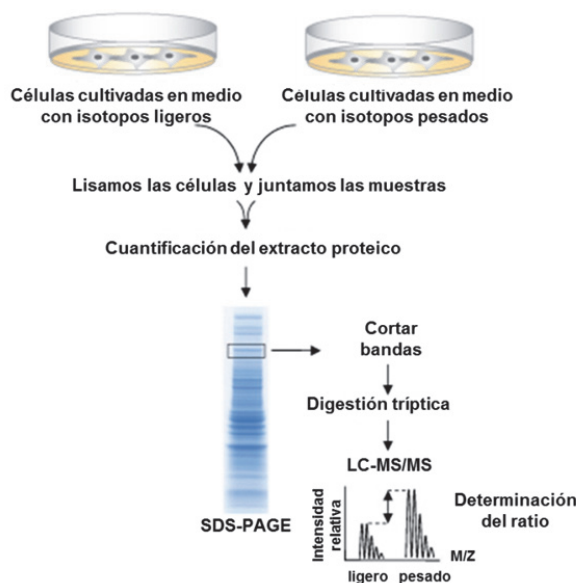
Las herramientas de proteómica cuantitativa basadas en la espectrometría de masas juegan un papel fundamental en la investigación biomédica para entender los procesos fisiológicos y patológicos debidos a los cambios dinámicos del proteoma. Este tipo de aproximaciones se basa en la comparación de dos o más estados diferentes de un mismo proteoma, usando marcajes isotópicos estables, lo que confiere una diferencia de masa en los espectros MS o MS/MS de cada uno de los péptidos analizados. La intensidad relativa evalúa la proporción exacta de cada proteína presente en las muestras originales. En estas técnicas, los isótopos se pueden introducir en la muestra mediante la incorporación metabólica de aminoácidos marcados (SILAC) (161, 162) o mediante una reacción química con un reactivo marcado isobáricamente (TMT o iTRAQ) (163, 164).

- **Marcaje metabólico SILAC**

El marcaje SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) se basa en la incorporación metabólica estable de aminoácidos marcados en uno o varios átomos pesados ( $^{13}\text{C}$  y/o  $^{15}\text{N}$ ) (165) al proteoma celular *in vivo* mediante cultivo celular. Normalmente se utilizan lisina y arginina marcadas, ya que la digestión con tripsina asegura que los péptidos trípticos tendrán su extremo carboxilo terminal marcado. Posteriormente, se mezcla la misma cantidad de células de los dos estados biológicos a comparar, se extraen las proteínas y se digieren con tripsina. Los péptidos resultantes se analizan por espectrometría de masas para su identificación y cuantificación. Dicha cuantificación se realiza comparando las intensidades de



los picos correspondientes al mismo péptido en el espectro MS, dado que coeluyen y se encuentran separados por la diferencia de masa que corresponde al marcaje isotópico (Figura 11).



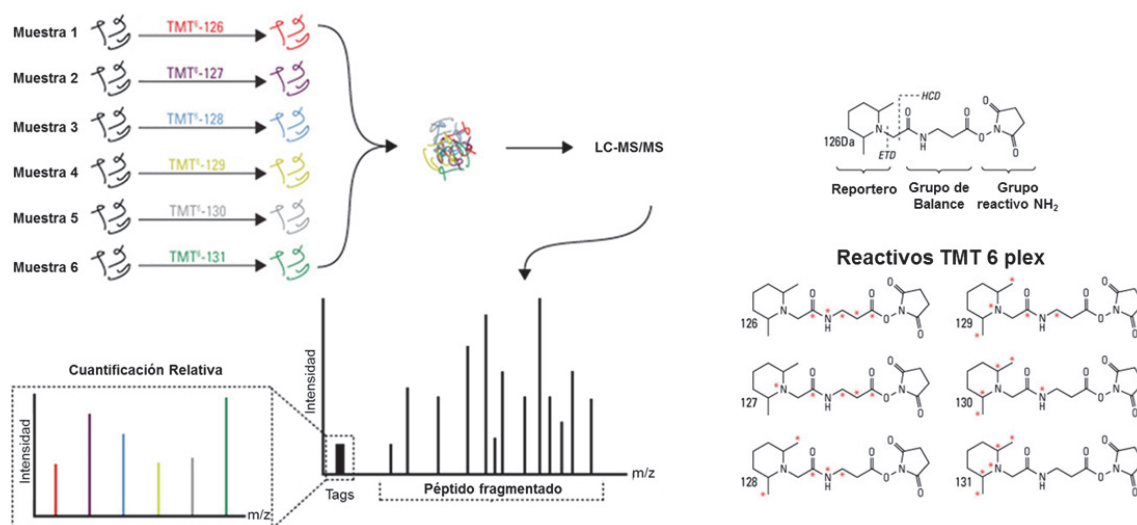
**Figura 11. Esquema de marcaje metabólico tipo SILAC (Adaptado de Thermo Scientific).**

Este tipo de marcaje tiene la ventaja de presentar una variabilidad analítica muy baja tras el procesamiento de la muestra, ya que la unión de las muestras es previa a la extracción de proteínas del lisado celular. Sin embargo, la técnica SILAC solo es aplicable a cultivos celulares y no a fluidos biológicos o a tejidos. Recientemente se han generado unos modelos *in vivo* con ratones (166) o *Drosophila melanogaster* (167) con dietas que incorporan lisina pesada, pero tienen un elevado coste económico y, desafortunadamente, no se pueden aplicar a modelos humanos.

- **Marcaje isobárico TMT o iTRAQ**

El marcaje isobárico se realiza *in vitro* y se fundamenta en la incorporación de reporteros químicos marcados isotópicamente que se unen covalentemente a los péptidos. No tiene restricciones en cuanto a su aplicabilidad al estudio de cualquier tipo de muestras biológicas. Sin embargo, presenta una mayor variabilidad experimental, porque los péptidos marcados se mezclan después de la digestión. Existen dos estrategias de marcaje: el marcaje isotópico con TMT (tandem mass tag) o iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification), que permiten la cuantificación relativa de 2 a 10 proteomas en el mismo experimento.

## Introducción



**Figura 12. Esquema de marcaje químico mediante TMT-6 plex (Adaptado de Thermo Scientific).** Tras la digestión triptica de las muestras proteicas, se procede al marcaje isobárico de los péptidos. Una vez realizado el marcaje con las seis etiquetas (tags) del TMT, se mezclan las muestras y se realiza su análisis mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS). Cuando se produce la fragmentación del péptido para la identificación de su secuencia, se liberan los tags de ese péptido para cada muestra, que tienen una  $m/z$  diferente permitiendo la cuantificación relativa de cada una de las muestras con respecto a las otras muestras marcadas.

El reactivo TMT o iTRAQ se compone de un grupo reportero, un grupo reactivo de unión a grupos amino del extremo N-terminal y de los residuos de lisina y un grupo de balance de masas. Los reactivos son isobáricos, y así, los péptidos marcados tienen la misma masa molecular, y eluyen y fragmentan a la vez. Durante la fragmentación, el enlace entre el grupo reportero y el grupo de balance de masas se rompe fácilmente y libera los iones reporteros monocargados de distinta masa (TMT:  $m/z$  126 a 131 y iTRAQ:  $m/z$  de 113 a 121) para cada una de las muestras. La intensidad de dichos iones reporteros permite la cuantificación relativa de las distintas especies marcadas (Figura 12). Otra diferencia respecto al SILAC es que la cuantificación se realiza a nivel del espectro MS/MS, y no de MS.

Las diferentes herramientas proteómicas nos ha permitido en esta tesis doctoral en ampliar el conocimiento de nuevas vías de señalización para FGFR4 que nos ayudan a explicar algunos de los efectos observados en células de CCR y de la identificación de nuevas proteínas controladas por Snail1 en el núcleo de las células mesenquimales y su papel en la adipogénesis.



## **OBJETIVOS**



Los principales objetivos de esta Tesis Doctoral están relacionados con el cáncer colorrectal. Por un lado, identificar las alteraciones presentes en dos antígenos asociados a tumor (FGFR4 y PIM1), su papel en la respuesta humoral y su relación con el proceso neoplásico en cáncer colorrectal. Por otro lado, hemos querido i) ampliar nuestro conocimiento sobre el papel de Snail en el estroma tumoral y, ii) estudiar procesos celulares alterados por Snail1 en la adipogénesis mediante proteómica cuantitativa.

De forma desglosada, los objetivos de esta Tesis Doctoral han consistido en:

**I.** Análisis genético y funcional de FGFR4 y PIM1 en cáncer colorrectal.

**I.a.** Estudio de la expresión diferencial de FGFR4 y PIM1 en líneas celulares de CCR y en tejido normal y tumoral de pacientes.

**I.b.** Descripción de las alteraciones genéticas de FGFR4 y PIM1 que puedan justificar la producción de autoanticuerpos en pacientes con CCR y/o su papel en carcinogénesis

**I.c.** Estudios funcionales del papel de FGFR4 en la tumorigénesis de cáncer de colon *in vitro* e *in vivo*. Evaluación de FGFR4 como posible nueva diana terapéutica en CCR.

**I.d.** Estudios funcionales del papel de PIM1 en tumorigénesis de cáncer de colon *in vitro* e *in vivo*, así como de las variantes mutantes detectadas en el análisis genético.

**II.** Estudio del papel de Snail en fibroblastos tumorales y adipogénesis

**II.a.** Descripción de proteínas y citoquinas afectadas por la sobreexpresión de Snail1 en células mesenquimales (3T3-L1 y mMSC) mediante proteómica cuantitativa que puedan participar en el mantenimiento del estado indiferenciado de estas células mesenquimales.

**II.b.** Análisis funcional de las proteínas alteradas por Snail en la diferenciación celular de preadipocitos.

**II.c.** Estudio de los efectos transcripcionales de Snail sobre los promotores de las proteínas alteradas.

**II.d.** Papel de la sobreexpresión del receptor huérfano nuclear Nr2f6 en adipogénesis y diferenciación.

**II.e.** Papel del bloqueo de IL-17 en diferenciación adipocítica.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**





## 7. Datos clínicos de los sueros y muestras tumorales

En los ensayos de ELISA para la detección de autoanticuerpos en pacientes con CCR se utilizaron un total de 40 muestras de suero de pacientes y 25 sueros de individuos control. Además, para el posterior análisis genético se obtuvieron muestras de tejido normal y tumoral de los mismos pacientes con CCR. Estas muestras se obtuvieron del Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid) y del Hospital de Cabueñes (Asturias) con el consentimiento informado de todos los pacientes. Todas las muestras se manejaron de forma anónima de acuerdo con las normas éticas y legales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de los hospitales Universitario Puerta de Hierro (Madrid) y el Hospital de Cabueñes (Asturias). Tanto el tejido tumoral como el normal se obtuvieron secuencialmente. Inmediatamente después de la cirugía se congelaron y conservaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Todas las muestras tumorales se evaluaron histológicamente por patólogos para especificar el estadio y grado. Los datos clínicos de los pacientes cuyo tejido tumoral y normal se utilizó para el análisis genético de FGFR4 y PIM1 se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Información clínica de las muestras de CCR tumorales y normales utilizadas para el análisis genético de FGFR4 y PIM1**

	<b>Características Clínicas</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>	Hombre	<b>29</b>	<b>72.5</b>
	Mujer	<b>11</b>	<b>27.5</b>
<b>Localización</b>	Colon	<b>12</b>	<b>30</b>
	Sigma	<b>5</b>	<b>12.5</b>
	Recto	<b>23</b>	<b>57.5</b>
<b>Estadía TNM</b>	Pólipo hiperp.	<b>6</b>	<b>15</b>
	T1N0M0	<b>1</b>	<b>2.5</b>
	T2N0M0	<b>7</b>	<b>17.5</b>
	T2N1M0	<b>1</b>	<b>2.5</b>
	T2N2M0	<b>1</b>	<b>2.5</b>
	T3N0M0	<b>2</b>	<b>5</b>
	T3N1M0	<b>5</b>	<b>12.5</b>
	T3N1M1	<b>3</b>	<b>7.5</b>
	T3N2M0	<b>9</b>	<b>22.5</b>
	T3N2M1	<b>2</b>	<b>5</b>
	T4N1M1	<b>2</b>	<b>5</b>
	T4N2M0	<b>1</b>	<b>2.5</b>

## **8. Líneas celulares**

Todas las células se crecieron en medio DMEM (Gibco/Biowest) suplementado con suero fetal bovino (Sigma) al 10% y penicilina/estreptomicina (Gibco) al 1% en un incubador con atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se detallan las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral.

### **8.1 Líneas celulares de CCR**

KM12C es una línea celular epitelial derivada de un carcinoma colorrectal humano en estadio B de Duke's con poca capacidad metastásica. Presenta inestabilidad de microsatélites y cromosómica. (168).

KM12SM es una línea celular aislada a partir de una metástasis de hígado producida por las células parentales KM12C inoculadas en la pared del ciego de un ratón "Balb/c nude" (168). Es una línea celular muy metastática hacia hígado que puede realizar todos los pasos de intravasación y extravasación. Presenta inestabilidad de microsatélites y cromosomal.

KM12L4 es una línea celular aislada a partir de una metástasis hepática producida por las células parentales KM12C inoculadas en el bazo de un ratón "Balb/c nude" (169). Es el resultado de cinco rondas de selección tras su reinyección en el bazo de ratones "Balb/c nude". Produce metástasis en hígado y, ocasionalmente, pulmón cuando se inocular en bazo de ratones atímicos.

SW480 es una línea celular epitelial tumorigénica de carcinoma colorrectal humano de estadio B de Duke's poco metastática. Presenta inestabilidad de microsatélites.

SW620 es una línea celular epitelial de carcinoma de colon transversal humano de estadio B de Duke's que se obtuvo del nódulo linfático del mismo paciente de donde se obtuvieron las células SW480 a partir del adenocarcinoma primario.

SW48 es una línea celular epitelial de carcinoma de colon transversal humano de estadio C de Duke's muy metastática.

Las líneas de cáncer Colorrectal KM12C, KM12SM y KM12L4 se obtuvieron del Dr. I Fidler (MD Anderson, USA) (169). Las líneas celulares SW48, SW480 y SW620 se obtuvieron de la ATCC.

### **8.2 Líneas celulares mesenquimales murinas**

3T3-L1 es una línea celular derivada de las células 3T3 obtenidas del tejido embrionario de un ratón Swiss (170). Es una línea celular preadipocítica con capacidad de diferenciarse a adipocitos. Presenta una morfología similar a las células fibroblásticas preadipocíticas que se encuentran en el estroma de los tejidos y que se diferencian a tejido adiposo.

mMSC son células madre mesenquimales obtenidas a partir de la médula ósea del fémur de ratones Balb/c (171). A pesar de ser una línea primaria son capaces de mantenerse en cultivo durante un alto número de pases y mantener su capacidad para diferenciarse en diferentes estirpes celulares, incluyendo osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

### **8.3 Otras líneas celulares**

HEK293 es una línea celular epitelial de riñón embrionario humano. Presenta una alta capacidad de división y es fácilmente transfectable por diferentes métodos. Por ello, HEK293 y sus líneas derivadas HEK293T y HEK293FT se utilizan de rutina para el empaquetamiento de retrovirus y/o lentivirus para su posterior utilización en procesos de transfección en otras líneas celulares.

BxPC3 es una línea celular epitelial de adenocarcinoma de páncreas humano.

## **9. Extracción de RNA de tejidos y líneas celulares**

El RNA total de tejido normal y tumoral se extrajo añadiendo 1 ml de Trizol (Invitrogen) por cada 100 mg de tejido y homogeneizando con un Potter-Elvehjem (VWR Internacional). A continuación, se incubó la muestra durante 5 min a temperatura ambiente. En el caso de extracción de RNA a partir de células, éstas se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm tras levantarlas de la placa de cultivo incubando 2 min con tripsina-EDTA 0.5% (Gibco) y resuspendiendo el precipitado en 1 ml de Trizol por cada  $5 \times 10^6$  células. Tras incubar la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente, en ambos casos, se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 min a 4° C, se recogió la fracción acuosa donde se encuentra el RNA y se añadió 1 volumen de etanol al 70%. Posteriormente, el RNA se purificó con el kit RneasyMini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La pureza se valoró usando el ratio de absorbancias 260/280 nm en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Technologies). Los ratios oscilaban entre 1.8 y 2 en todas las muestras. Finalmente, se evaluó la calidad del RNA mediante su análisis en chip Experion (Biorad).

## 10. Análisis de las secuencias genéticas de FGFR4 y PIM1

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó por RT-PCR a partir de 1 µg de RNA total de tejido o de líneas celulares usando el kit “Superscript III first-strand synthesis system” (Invitrogen) con oligodT como oligonucleótido de amplificación. Para la primera reacción de preincubación, se mezcló 1 µg de RNA, 1 µl de oligo dT, 1 µl de 10 mM dNTPs y agua DEPC en un volumen final de 10 µl y se incubó durante 5 min a 65°C e inmediatamente después 5 min en hielo. A continuación, se añadió a cada tubo la mezcla de síntesis de cDNA que contiene 1µl de tampón 10x RT, 1 µl de 0.1 M DTT, 2 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de RNasa y 1 µl de Superscript III RT. La mezcla se incubó a 50°C durante 50 min y se paró a 85°C durante 5 min. Por último, se añadió 1 µl de RNasa H y se incubó durante 20 min a 37° C. Las concentraciones de cDNA obtenidas se midieron en el Nanodrop ND-1000.

Para la secuenciación del mensajero de FGFR4 y PIM1 se diseñaron oligonucleótidos que amplificaban fragmentos de 1000 pb para su secuenciación directa. Los cuatro pares de oligos (A, B, C y D) utilizados para la secuenciación del mensajero de FGFR4 se han descrito previamente (172). Para PIM1 se diseñaron dos parejas de oligos (A y B). Todos los oligonucleótidos se obtuvieron de Sigma (Tabla 3).

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación directa de FGFR4 y PIM1**

Gen	Par de oligos		Secuencia (5' → 3')
FGFR4	FGFR4_A	Directo	GGCAGTTGGTGGGAAGTCCAGC
	FGFR4_A	Reverso	GTGGGGCTGGGCATCGC
	FGFR4_B	Directo	GTGGGCAGCATCCGCTATAACTAC
	FGFR4_B	Reverso	AACTCCCATAGTGGGTCGAGAGGTA
	FGFR4_C	Directo	AGTTCTCCCTGGAGTCAGGCTCTT
	FGFR4_C	Reverso	GGCCGTTGCTGGTTTTCTTATAGTA
	FGFR4_D	Directo	GGTGTCTGCACCCAGGAAGG
	FGFR4_D	Reverso	CCAGCCTATGTGCCTGCACAG
PIM1	PIM1_A	Directo	CAGCCGCAACGCCACCCGCAGCCA
	PIM1_A	Reverso	TGGAGCACCCCGCAGTTGTGGCAG
	PIM1_B	Directo	GGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATCAC
	PIM1_B	Reverso	TCAAGCACTGTCCTGCTTGGC

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µl con las siguientes concentraciones de los reactivos: 0.5 µM oligonucleótidos directo y reverso, 200 µM dNTPs, 2

µl de buffer 10X PCR Advantage 2 y 1.25 U de la polimerasa Advantage 2 (Clontech). Se utilizó el programa de amplificación de 1 ciclo (1 min a 95°C) y 35 ciclos (30 s a 95°C y 3 min a 68°C) y un ciclo final de 3 min a 68°C. Las amplificaciones de DNA procedentes de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE en presencia de Gel Red (Biotium). La exonucleasa I (USB) y la fosfatasa alcalina de gamba (USB) se añadieron a los productos de PCR para eliminar restos de oligonucleótidos y poder secuenciar directamente. Estos fragmentos se enviaron al servicio de secuenciación del CNIO.

## 11. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 11.1. PCR semicuantitativa

El cDNA se obtuvo mediante el kit de síntesis Superscript III (Invitrogen). Los niveles de mRNA de los genes TGFβ1, familia FGFR y GAPDH en las líneas celulares de CCR se analizaron por PCR semicuantitativa. También se analizó por PCR semicuantitativa la expresión de los factores de transcripción que controlan la adipogénesis en células 3T3-L1. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%. En la Tabla 4 se detallan los oligos que se utilizaron para estos ensayos.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR de los genes indicados**

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Especie
<b>β-Actina</b>	Directo	CATGTACGTAGCCATCCAGGC	Ratón
	Reverso	CTCTTTGATGTCACGCACGAT	Ratón
<b>C/EBPα</b>	Directo	CCCGGCCGCTTCAACGACGAGTTC	Ratón
	Reverso	GATGCCCCGCAGCGTGTCCAGTTCA	Ratón
<b>C/EBPβ</b>	Directo	CCGCCGCCCGCCGCTTTAGA	Ratón
	Reverso	CCGCCGTCAGCTCCAGCACCTTGTG	Ratón
<b>GAPDH</b>	Directo	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGT	Humano
	Reverso	CGGCCATCACGCCACAGTTTC	Humano
<b>FGFR1</b>	Directo	CACAAGCCACGGCGGACT	Humano
	Reverso	TGATGCTCCAGGTGGCAT	Humano
<b>FGFR2</b>	Directo	CGTTGCCATTCAAGTACTG	Humano
	Reverso	GACAAAATCTTCCGCACCATC	Humano
<b>FGFR3</b>	Directo	CAGTTGGTCTTCGGCAGC	Humano
	Reverso	TGCTGCCAAACTTGTCT-	Humano
<b>PPARγ</b>	Directo	TTGAGTGCCGAGTCTGTGGGGATAA	Ratón
	Reverso	CAGGGAGGCCAGCATCGTGTAGA	Ratón
<b>TGFβ1</b>	Directo	ACCGGCCTTTCCTGCTTCTCA	Humano
	Reverso	CGCCCGGTTATGCTGGTTGT	Humano

## 11.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Las diferencias de expresión de los genes analizados se realizaron mediante cuantificación relativa. Se comparó entre diferentes muestras, la cantidad relativa o relación del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (control endógeno).

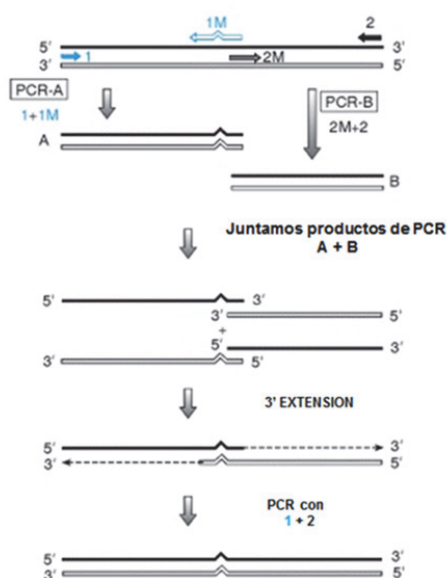
**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la determinación por qPCR de los genes indicados**

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Especie
<b>β-Actina</b>	Directo	GCCACAGGATTCCATACC	Ratón
	Reverso	GTGCGTGACATCAAAGAG	Ratón
<b>CDH1</b>	Directo	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG	Humano
	Reverso	GTGTATGTGGCAATGCGTTC	Humano
<b>Cbx6</b>	Directo	AAGGTGATTGACAAGGGTCC	Ratón
	Reverso	GGCTTGTAGAGCGCAAATGT	Ratón
<b>C/ebpα</b>	Directo	GACATCAGCGCCTACATCGA	Ratón
	Reverso	TCGGCTGTGCTGGAAGAG	Ratón
<b>C/ebpβ</b>	Directo	ATTTCTATGAGAAAAGAGGCGTATGT	Ratón
	Reverso	AAATGTCTTCACCTTAATGCTCGAA	Ratón
<b>GAPDH</b>	Directo	CCACTCCTCCACCTTTGAC	Humano
	Reverso	ACCCTGTTGCTGTAGCCA	Humano
<b>Nr2f6</b>	Directo	CCTCACCGAGTATGTGCGTG	Ratón
	Reverso	AAGGTGCTCCCTGACAGAAG	Ratón
<b>OsmR</b>	Directo	AAACATGATATTTGAGATAGAG	Ratón
	Reverso	CTTATGAAATGTTTGACACACTC	Ratón
<b>Ppary</b>	Directo	CAAGAATACCAAAGTGCGATCAA	Ratón
	Reverso	GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAATAAG	Ratón
<b>Prrx1</b>	Directo	TTACCCGGATGCTTTTGTTT	Ratón
	Reverso	AAGTAGCCATGGCGCTGTA	Ratón
<b>SNAIL1</b>	Directo	GGTTCTTCTGCGCTACTGCT	Humano
	Reverso	TAGGGCTGCTGGAAGGTAAA	Humano
<b>Trip4</b>	Directo	TGGCTAAGGCACAAGAAAGC	Ratón
	Reverso	AAGAGCCACAGAACAAGCAG	Ratón
<b>TWIST1</b>	Directo	GTCCGCAGTCTTACGAGGAG	Humano
	Reverso	TGGAGGACCTGGTAGAGGAA	Humano
<b>ZEB1</b>	Directo	GCACAAGAAGAGCCACAAGTA	Humano
	Reverso	GCAAGACAAGTTCAAGGGTTC	Humano

En las qPCR realizadas se utilizó como fluoróforo SYBR Green que se une inespecíficamente al DNA de doble cadena y produce fluorescencia. El volumen final de cada reacción fue de 20  $\mu$ l, en los que se incluía 1  $\mu$ l de cDNA, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido (directo y reverso) y la mezcla de reacción 1x iQ SYBR Green SuperMix que contenía la polimerasa iTaq, dNTPs,  $MgCl_2$ , SYBR Green I, potenciadores, estabilizadores y fluoresceína. La PCR y la obtención de datos se realizaron en un IQ5 (BioRad). Para el análisis de los marcadores de la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares de CCR se utilizaron los oligonucleótidos descritos previamente (173). Para los factores de transcripción que participan en la diferenciación adipocítica (174) se utilizaron los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 5.

### 11.3. Mutagénesis dirigida por PCR

Para obtener las secuencias codificantes de PIM1 y sus variantes, identificadas en los pacientes de CCR, se realizaron dos reacciones de PCR independientes en las que se amplificó el gen seleccionado. Cada reacción utilizó un oligonucleótido flanqueante que hibrida con un extremo de la secuencia de interés y otro oligonucleótido que hibrida en el sitio donde se encuentra la mutación y contiene el nucleótido afectado por dicha mutación. Así, se amplifica la secuencia con la mutación deseada utilizando dos oligos internos solapantes, de manera que los dos fragmentos generados en la primera PCR se fusionen en una segunda PCR utilizando oligos flanqueantes (175, 176) (Figura 13).



**Figura 13. Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR.** Se realizan dos reacciones de PCR (A y B) con los oligonucleótidos indicados en la Tabla 6. Se combinan los productos de las PCR A y B, y se realiza una nueva PCR de solapamiento en la cual, cuando se desnaturalizan las cadenas de los productos de PCR A y B se forman heteroduplex entre ambos. El producto que obtenemos en la PCR de solapamiento amplificada con los oligos externos (1 y 2 en la figura) presentará la mutación introducida en los oligonucleótidos.



Las PCRs se realizaron utilizando como molde el clon de PIM1 número 4591723 de la “Mammalian Gene Collection” (MGC) (177) clonado en el vector pET28a. Para la PCR se utilizó la polimerasa “Advantage 2” y los oligos que hibridan en 5’ y 3’ de la secuencia codificante con la diana *EcoRI* y *KpnI*, respectivamente, para su clonaje en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Los oligos utilizados se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la generación por PCR de las secuencias mutantes de PIM1**

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
<b>PIM1 44 kDa</b> (wild type)	Directo	AGGAATTCATGCCGCACGAGCCCCAC
	Reverso	CGCGGTACCCTATTTGCTGGGCCCCGG
<b>PIM1 34 kDa</b> (wild type)	Directo	AGGAATTCATGCTCTTGTC AAAATCAAC
	Reverso	CGCGGTACCCTATTTGCTGGGCCCCGG
<b>PIM1 His48Asp</b>	Anti-sentido	GGCGTTGCGGCTGTCGCTGCGGCTGGC
	Sentido	AGCCGCAACGCCACCCGC
<b>PIM1 Ala315Thr</b>	Anti-sentido	CCCCAGGGACCAGACTGTCGCCGACCTGCCATG
	Sentido	GTCTGGTCCCTGGGGATC
<b>PIM1 Pro402Leu</b>	Directo	AGGAATTCATGCTCTTGTC AAAATCAAC
	Reverso	CGCGGTACCCTATTTGCTGGTCCCCGGCGACAG
<b>PIM1 Δ303</b>	Directo	AGGAATTCATGCTCTTGTC AAAATCAAC
	Reverso	CGCGGTACCCTATTTGACTCTGGAGGGCTATACACT

Los oligonucleótidos subrayados indican la secuencia que forman las dianas de restricción

## 12. Vectores de expresión en células de mamífero y bacteria

### 12.1. Vectores para transfección transitoria en células de mamífero: silenciamiento y expresión

Para silenciar de manera transitoria la expresión de distintos genes se utilizaron RNAs de interferencia “siRNA MISSION” (Sigma). Para las transfecciones,  $5 \times 10^5$  células SW620 mantenidas en DMEM con 10% de suero durante 24 h se transfectaron con 55 pmol de siRNA, 2 µl del agente de transfección JetPrime (PoliplusTransfection) y 200 µl de buffer JetPrime. Tras 48 h, los niveles de FGFR4 se analizaron mediante WB y RT-PCR (178). Para silenciar la expresión de Snail1, Nr2f6, Prrx1, Trip4 y Cbx6 se ajustaron las condiciones a la línea 3T3-L1. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células 3T3-L1 y se mantuvieron en DMEM al 10% de suero durante 24 h. Las células se transfectaron con 27.5 pmol de siRNA, usando 1 µl del agente de transfección

JetPrime y 100 µl de buffer JetPrime. Las células transfectadas se crecieron en p60 en medio completo.

Utilizamos el vector pcDNA3.1 de expresión en mamíferos para los ensayos de expresión transitoria. Para PIM1 y sus variantes, tras realizar la mutagénesis dirigida y su clonaje en pcDNA3.1, las células se transfectaron con JetPrime. Para la expresión de Nr2f6, se obtuvo el clon Nr2f6 de la colección IMAGE-MGC (clon #MGC: 6088 IMAGE: 3582557). Para su clonaje en pcDNA3.1 se amplificó su secuencia por PCR con la polimerasa “Advantage 2” usando los primers: 5'-AGGAATTCATGGCCATGGTGACCGGT-3' y 5'-CGCGGTACCCTAGCCCGAGCCATAGGG-3'. El producto de PCR se digirió con *EcoRI* y *KpnI* y se clonó en pcDNA3.1. El clonaje se confirmó por secuenciación. Las células se transfectaron usando JetPrime como se ha descrito. En todos los casos a las 24-48 h post-transfección, se verificó mediante diferentes técnicas experimentales la sobreexpresión o inhibición de las proteínas de interés.

### 12.2. Transfección estable en células de mamífero

El silenciamiento estable de FGFR4 en las líneas SW480 y SW48 se llevó a cabo mediante infección retroviral utilizando los vectores pRS (Origene) que contenían los shRNAs TI378641, TI378624, TI378643 y TI378644 para FGFR4 (NM\_022963) y como control un shRNA que no reconoce ninguna secuencia humana (TR30003). Para generar los retrovirus, se realizó la transfección de las células HEK293FT con los vectores empaquetadores pRS, pNGVL-gag-pol y pNGVL-VSVG usando JetPrime. Después de incubar las células durante 12-15 h en medio libre de suero, el medio se reemplazó con DMEM al 10% de suero y antibióticos. Al día siguiente, los medios que contienen los retrovirus se centrifugaron, se diluyeron 1:2-1:10 en DMEM con 10% de suero y antibióticos, y la mezcla se añadió directamente a las células SW480 y SW48. Después de tres días de incubación, las líneas celulares infectadas con el shRNA se seleccionaron durante 2-3 semanas usando 1 µg/ml puromicina (Sigma). Una vez seleccionadas, las células se mantuvieron con 0.5 µg/ml de puromicina en el medio de cultivo.

Las líneas celulares 3T3-L1 y células madre mesenquimales murinas (mMSC) con sobreexpresión estable de Snail1 fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Antonio García de Herreros (IMIM-Hospital del mar, Barcelona, España). Para obtener las líneas estables se transfectaron 6 µg de pcDNA3 Snail1-HA (Snail1) o pcDNA3 control (Mock) usando lipofectamina (Invitrogen). Las células se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 durante 3-4 semanas. Para mantener la selección de las células transfectadas se mantuvieron con 0.5 mg/ml G418 en el medio de cultivo (136).

### 12.3. Vectores de expresión en *E. coli*

Para la obtención del clon de FGFR4 se recurrió al repositorio PlasmID (Harvard, USA) (179). FGFR4 se encontraba clonado en un vector pDONR201 con número de identificación HsCD00045475. Para la obtención del clon de PIM1 en pET28a se recurrió a la colección MGC (clon #MGC: 14 IMAGE: 4591723).

FGFR4 se amplificó por PCR con la polimerasa “Advantage 2” para, posteriormente, realizar el subclonaje en el vector pET28a. La digestión del DNA se realizó en 50  $\mu$ L conteniendo 1  $\mu$ g del producto de PCR, 5  $\mu$ L de Buffer 2 (New England Biolabs), 0.5  $\mu$ L de BSA 100X y 10 U de *Nde*I y *Hind*III (New England Biolabs). La reacción se incubó 3 h a 37°C y las enzimas se inactivaron a 60°C durante 20 min. El DNA digerido se purificó con el kit QIAQuick (Qiagen). Posteriormente, se realizó la ligación en un volumen de 15  $\mu$ L utilizando 200 fmol de producto de PCR digerido mezclado con 100 fmol de vector, 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa y 1.5  $\mu$ L de tampón de ligación. La mezcla se incubó a 16°C toda la noche. Finalmente, las ligaciones se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Para su transformación, bacterias competentes se descongelaron en hielo mezclando 50  $\mu$ L de bacterias con el DNA transformante (5  $\mu$ L de la ligación). Tras mantener en hielo la mezcla durante 30 min, se aplicó un choque térmico de 42°C durante 45 s. Tras mantenerlas de nuevo en hielo durante 2 min, se añadió 1 ml de medio SOC y las células se incubaron a 37°C durante 1 h a 225 rpm. Por último, se centrifugaron 5 min a 5000 rpm, se resuspendieron en 100  $\mu$ L de medio SOC y se sembraron en una placa de LB-agar con kanamicina. Finalmente, una colonia aislada se creció durante toda la noche a 37°C en LB y los DNA plasmídicos se purificaron con el kit “DNA Wizard<sup>TM</sup> Miniprep” (Promega). Tras verificar las secuencias, los DNA plasmídicos se transformaron en células *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) según el protocolo descrito previamente.

### 13. Expresión de las proteínas en *E. coli*

Colonias individuales de células BL21 (DE3) de *E. coli* conteniendo el cDNA de las proteínas de interés se crecieron toda la noche a 37°C con agitación en medio LB con 100  $\mu$ g/ml de kanamicina. Los cultivos se relanzaron tras hacer una dilución 1:100 en 1 litro de medio LB con 100  $\mu$ g/ml del antibiótico correspondiente y se crecieron a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ( $OD_{600nm}$  0.6-0.8), momento en el que se añadió 0.4 mM isopropil 1- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG). Tras 4 h de inducción, las células se centrifugaron a 6000 rpm y el precipitado se resuspendió en 50 ml de la solución de

resuspensión 10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl y 0.1 mM EDTA conteniendo inhibidores de proteasas (Roche). Para lisar las células, se añadieron 5.5 ml de 10% laurilsarcosinato sódico. Después de 30 min en hielo, se añadieron 6.1 ml de 10% Triton X-100 y se dieron 3 pulsos de sonicación de 1 min a una amplitud del 10% (Sonifier 150, Branson). Tras la lisis celular, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min a 4°C para separar la fracción soluble de la insoluble.

### **14. Purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis**

La purificación de las proteínas fusionadas al tag de histidinas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) utilizando columnas HisTrap™ “FF Crude columns” (GE Healthcare) de 5 ml acopladas a un equipo ÄKTA Prime (GE Healthcare). El programa de purificación constaba de los siguientes pasos: lavado de la columna con 25 ml de agua y tampón de equilibrado de la columna a un flujo de 5 ml/min, equilibrado de la columna con 10 ml de tampón de elución a un flujo de 5 ml/min y reequilibrado en tampón de equilibrado a un flujo de 5 ml/min, inyección de la muestra a un flujo de 5 ml/min, lavado de la columna con 50 ml de tampón de equilibrado y elución de las proteínas unidas a la columna con un gradiente de imidazol desde 20 mM (tampón de equilibrado) hasta 0.5 M (tampón de elución). Las fracciones recogidas se dializaron frente a PBS durante toda la noche a 4°C con agitación para eliminar el imidazol.

### **15. ELISA para la detección de autoanticuerpos en el suero de los pacientes y ELISA de IL-17**

Se tapizaron 0.3 µg de las proteínas purificadas (FGFR4 y PIM1) diluidas en PBS durante toda la noche en placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc). Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS con Tween-20 al 0.1% (PBST) y se bloquearon con PBS-leche desnatada 3% durante 2 h a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional con PBST, las muestras de suero humano (dilución 1:50 en MPBS) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió un anticuerpo policlonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa diluido 1:3000. La señal se detectó con el sustrato 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma) durante 10 min, parando la reacción con 1 M HCl y midiendo la absorbancia a 450 nm con el lector de microplacas Varioskan Flash Multimode Reader (ThermoScientific). Como controles negativos se utilizaron Anexina IV comercial y la albumina de suero humana HSA (180).

La cuantificación absoluta de la citoquina murina IL-17 en los medios condicionados se llevó a cabo utilizando el ELISA comercial ELM-IL17-001 (RayBiotech).

## 16. Inmunodetección de proteínas

### 16.1. Anticuerpos

#### 16.1.1. Anticuerpos primarios

Las características de cada anticuerpo utilizado en los ensayos de WB, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, o ensayos de bloqueo se especifican en la Tabla 8.

**Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para distintas técnicas**

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Uso	Dilución	Especie
<b>AKT</b>	Cell Signaling	9272	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>BCL-2</b>	Santa Cruz	sc-509	<b>WB</b>	1:300	Ratón
<b>BCL-XL</b>	Santa Cruz	sc-634	<b>WB</b>	1:300	Ratón
<b>CASPASE 3</b>	Santa Cruz	sc-7272	<b>WB</b>	1:300	Conejo
<b>CBX6</b>	Abcam	ab135117	<b>WB</b>	1:1000	Cabra
<b>CDH1</b>	BD Biosciences	610182	<b>WB/IF</b>	1:200/1:50	Ratón
<b>CHD3</b>	Cell Signaling	4241	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>CHD4</b>	Cell Signaling	11912	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>C-MYC</b>	Roche	11814150001	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>eiF3D</b>	Abcam	ab155419	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>ERK</b>	Cell Signaling	sc-154	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>FAK</b>	SCBT	sc557	<b>WB</b>	1:2000	Conejo
<b>FAM120A</b>	Sigma	SAB3500232	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>FGFR4</b>	SCBT	sc-124	<b>WB/IF/IP/B</b>	1:1000/1:200/ *	Conejo
<b>GST</b>	GE Healthcare		<b>B</b>	*	
<b>HDAC1</b>	Cell Signaling	5356	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>HDAC2</b>	Cell Signaling	5113	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>IL-17</b>	R&D	MAB421	<b>BA</b>	500 ng/ml	Conejo
<b>JNK</b>	Cell Signaling	9258	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>LAMIN B</b>	Calbiochem	mAb3536	<b>WB</b>	1:1000	Rata
<b>MTA1</b>	CellSignaling	5647	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>MTA2</b>	Abcam	ab8106	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>NR2F6</b>	Santa Cruz	sc-23229	<b>WB</b>	1:2000	Conejo
<b>p27</b>	Santa Cruz	Sc-528	<b>WB</b>	1:500	Ratón
<b>p-AKT (Ser473)</b>	Cell Signaling	4060	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>pERK (Thr202/Tyr204)</b>	Cell Signaling	9101	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>p-FAK (Tyr397)</b>	BD	611722	<b>WB</b>	1:2000	Conejo

<b>PIM1</b>	Abnova	H00005292	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>pJNK(Thr183/Tyr185)</b>	Cell Signaling	9255	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>p-mTOR (Ser2448)</b>	Cell Signaling	5536	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>p-RPS6 (Ser235/236)</b>	Cell Signaling	4857	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>PRRX1</b>	Sigma	SAB2500829	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>pSRC</b>	Cell Signaling	2101	<b>WB</b>	1:2000	Cabra
<b>p-SRC (Tyr416)</b>	Cell Signaling	2101	<b>WB</b>	1:1000	Cabra
<b>p-STAT3 (Tyr705)</b>	Cell Signaling	9131	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>RBBP4</b>	Abcam	ab79416	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>RBBP7</b>	Cell Signaling	6882	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>RHO GDI</b>	Santa Cruz	sc-360	<b>WB</b>	1:5000	Ratón
<b>SRA1</b>	Santa Cruz	sc-271377	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>SRC</b>	R&D Systems	P12931	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>SRC</b>	Cell Signaling	P12931	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>STAT3</b>	Cell Signaling	4904	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>TLN1</b>	Sigma	T3287	<b>WB</b>	1:1000	Conejo
<b>TRIP4</b>	Abcam	ab70627	<b>WB</b>	1:1000	Cabra
<b>TUBULIN</b>	Sigma	T9026	<b>WB</b>	1:5000	Conejo
<b>VIMENTINA</b>	AbCam	ab7783	<b>WB</b>	1:1000	Ratón
<b>YAP1</b>	Cell Signaling	4912	<b>WB</b>	1:1000	Conejo

**WB: Western Blot; IF: Inmunofluorescencia; B: Ensayo de bloqueo; IP: Inmunoprecipitación**

\* La dilución de los anticuerpos para los ensayos de bloqueo se indica en la sección de resultados para cada experimento.

### 16.1.2. Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios usados en los ensayos de esta Tesis Doctoral se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Anticuerpos secundarios utilizados en WB e IF**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Referencia</b>	<b>Uso</b>	<b>Dilución</b>	<b>Especie</b>
<b>anti- IgG Ratón peroxidasa</b>	Sigma	A4416	<b>WB</b>	1:5000	Conejo
<b>anti- IgG Conejo peroxidasa</b>	Sigma	A6154	<b>WB</b>	1:5000	Ratón
<b>anti- IgG Cabra peroxidasa</b>	Dako C.	P0449	<b>WB</b>	1:10000	Ratón
<b>anti- IgG Conejo AlexaFluor 488</b>	Sigma	F0382	<b>IF</b>	1:200	Ratón
<b>anti- IgG Ratón AlexaFluor 488</b>	Sigma	F0257	<b>IF</b>	1:200	Conejo
<b>Faloidina TRITC*</b>	Sigma	P1951	<b>IF</b>	1:800	

**WB: Western Blot; IF: Inmunofluorescencia**

\* Faloidina utilizada para la detección de la Actina F.

## 16.2. Western blot

Los extractos proteicos se obtuvieron tras levantar las células con tripsina-EDTA durante 2 min a 37° C. Tras centrifugar 1200 rpm durante 5 min se resuspendieron en 100 µl de solución RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). La cuantificación se realizó mediante Bradford o el 2D-Quant kit (GE Healthcare) tras centrifugar las muestras a 12000g durante 30 min a 4°C (73). 25 µg de cada extracto proteico se fraccionaron en un gel monodimensional de SDS-PAGE al 10%. Para realizar la inmunodetección las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra) durante 1 h a 100 V utilizando un Mini Trans-Blot Cell (BioRad). Después del bloqueo con 5% de leche desnatada en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos mono o policlonales de las proteínas seleccionadas durante toda la noche a 4°C o 2 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBST, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IgG de ratón, conejo o cabra conjugados con HRP. Tras eliminar los restos de anticuerpo secundario con varios lavados de PBST, se reveló el inmunoensayo usando SuperSignal West Pico o Femto maximum sensitivity substrate (Pierce) dependiendo de la abundancia de la proteína en la muestra. La abundancia de las proteínas mediante WB se cuantificó mediante densitometría usando el software de análisis QuantityOne 1D v4.6 (BioRad).

## 16.3. Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico de FGFR4 se analizaron 67 tumores de CRC procedentes de hemicolectomías fijados en formaldehído y embebidos en parafina. Se seleccionaron aquellas áreas bien preservadas y representativas tanto del tumor como de la mucosa normal. La inmunohistoquímica se realizó en secciones de 6 µm de manera automática (Dako autostainer). El anticuerpo primario para FGFR4 (SCBT) se usó a dilución 1:100. La reactividad se clasificó según la intensidad de tinción y cuantificando como 0, tinción ausente; 1, tinción baja; 2, tinción moderada o 3, tinción intensa. Posteriormente, se realizó la tinción de los portales con 3,3' Diaminobencidina (Sigma).

## 16.4. Microscopia confocal

Las células se fijaron con 1% paraformaldehído y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 en PBS antes de la incubación con los anticuerpos específicos o faloidina-TRITC durante 1

h a 37°C. Los anticuerpos para FGFR4 o E-cadherina se detectaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 488. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las células se observaron con el microscopio confocal TCS-SP5-AOBS-UV (Leica-Microsystems). Las imágenes se adquirieron con un objetivo de 63x en aceite de inmersión usando el software Leica Confocal Soft.

### 16.5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los experimentos de ChIP se llevaron a cabo con el DNA de las células mMSC que sobreexpresan Snail1. Las células mMSC-Snail1 se fijaron con 1% formaldehído durante 10 min a 37°C, parando la reacción con 0.125 M glicina durante 2 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron con buffer de lisis frío (10 mM EDTA, 0.1% NP-40, 10% glicerol y 50 mM Tris pH 8.0) durante 20 min en hielo. Los precipitados nucleares se lisaron con 1% SDS, 10 mM EDTA y 50 mM Tris a pH 8.0 y los extractos se sonicaron. Se diluyeron las muestras 1:10 en buffer de dilución y la IP se realizó durante toda la noche a 4°C usando un anticuerpo anti-Snail1 y un anticuerpo irrelevante control. El anticuerpo monoclonal anti-Snail1 fue cedido por el Dr. Antonio García de Herreros y se utilizó tanto para la inmunoprecipitación como para WB (130). El DNA se purificó con el kit GFX (GE Healthcare) y se eluyó en Agua MilliQ. Las regiones de los promotores de interés se analizaron por PCR cuantitativa con SYBR Green (BioRad) con los oligonucleótidos de la Tabla 7.

## 17. Inhibidores

Para los diferentes ensayos funcionales las células se trataron con los compuestos que se detallan a continuación:

### 17.1. Inhibidores de FGFR4 y PIM1

Para la inhibición de FGFR4 se utilizaron los compuestos PD173074 (Sigma) y TKI-258 (Novartis). PD173074 es una piridopirimidina permeable de membrana que es un potente inhibidor competitivo de la unión del ATP a los receptores tirosín quinasa FGF/VEGF y se comporta como un inhibidor reversible de este tipo de receptores. Además, es un fuerte inductor de apoptosis (181). El PD173074 se disuelve en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mM (181). El TKI-258 o Dovitinib fue cedido por Novartis, se trata de un inhibidor de tirosín quinasa que se ha mostrado muy eficaz en estudios de fase I por sus concentraciones bajas de actuación y una inhibición muy efectiva de los receptores FGFR,



VEGFR y PDGFR, entre otros (182). El Dovitinib se disuelve en DMSO a una concentración de 10 mM.

El inhibidor SMI-4a (Sigma) de PIM1 se trata de un derivado de benciladenina. Es un inhibidor competitivo de la unión de ATP específico para la familia PIM; y cuya inhibición es más sensible para PIM1 respecto de otros miembros de la familia PIM (183-185). El SMI-4a se disuelve en DMSO a una concentración 1.25 mM. En los experimentos realizados la concentración utilizada fue de 20 nM.

## 17.2. Otros Inhibidores utilizados en líneas celulares de CCR

Otros inhibidores utilizados fueron: PP2 (Sigma) para SRC, el inhibidor JNK inhibidor II para JNK y UO126 (Calbiochem) para MEK1/2. Estos inhibidores se utilizaron a una concentración entre 3  $\mu$ M y 15  $\mu$ M (178).

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la validación por qPCR de los fragmentos de los promotores de ratón**

Gen	Oligo	Secuencia (5' → 3')
<b>Cbx6_región 1</b>	Directo	CAGTCTGGCCCCACCTTGTC
	Reverso	AGGTCACAAATGACACAGAC
<b>Cbx6_región 2</b>	Directo	TTAAGAGCCTTCGCGCGC
	Reverso	ATACTCCCTGCTCCCGCG
<b>Nr2f6_región 1</b>	Directo	CCTCTCCCCTGTAGGCCT
	Reverso	GGGGCTGCGATGGGTACT
<b>Nr2f6_región 2</b>	Directo	CTTGAAGCCTGAAAGGAGAG
	Reverso	GCTTTGCTCTGCGCGGCT
<b>OsmR</b>	Directo	CTGAACGCCGAAAGTCAACT
	Reverso	GCATCGTTGTTCTGAGGG
<b>Prrx1_región 1</b>	Directo	CAGCTACGGGCACGTTCT
	Reverso	TGACCAGTGGCAGCGACA
<b>Prrx1_región 2</b>	Directo	TTTGTCCCTACAGCGCCA
	Reverso	GACAGAACAGGATAGGTGTC
<b>Pten</b>	Directo	CCGTGCATTTCCCTCTACAC
	Reverso	GAGGCGAGGATAACGAGCTA
<b>Trip4</b>	Directo	GCACAATATGGCTGGCGT
	Reverso	GGACACCTAGTGATTTTGT

## **18. Ensayos funcionales *in vitro* en las líneas celulares.**

### **18.1. Adhesión celular**

Para los ensayos de adhesión, las placas de 96 pocillos se tapizaron con matrigel (0.4  $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) (BD Biosciences) en 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  pH 8.8 durante toda la noche a 4°C. Después se incubó con el medio de adhesión (DMEM con 0.5% BSA) durante 2 h a 37°C para bloquear los sitios inespecíficos. Las células de CCR se mantuvieron en medio sin suero durante 5 h y se marcaron con BCECF-AM (Molecular Probes) durante 30 min a 37°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 4 mM PBS-EDTA, se añadieron  $10^5$  células por pocillo por triplicado y se incubaron durante 30 min. Para eliminar las células no adherentes, se eliminaron con varios lavados con DMEM. Finalmente, las células adheridas se lisaron con 1% SDS en PBS y la fluorescencia se cuantificó en un Varioskan Flash Multimode Reader.

### **18.2. Invasión celular**

Para los ensayos de invasión,  $8 \times 10^5$  células se resuspendieron en medio de invasión (DMEM con 0.5% BSA) y se añadieron a cámaras de invasión Transwell (Costar) con tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  recubiertos con 35-50  $\mu\text{l}$  de la dilución de matrigel 1:3. El compartimento inferior de las cámaras de invasión contenía medio con 10% de suero. Después de 22 h de incubación a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ , las células no invasivas se eliminaron de la superficie del filtro y las células que migraron a través del filtro, se fijaron con 4% paraformaldehído (Sigma), se tiñeron con cristal violeta y se contaron en el microscopio.

### **18.3. Cierre de herida (“wound healing”)**

Para los ensayos de cierre de herida,  $10^6$  células se sembraron en placas de 24 pocillos por triplicado. Una vez adheridas las células, se realizó en la monocapa de células una herida de 1 mm de grosor utilizando una punta de pipeta. Se reemplazó el medio y se tomaron imágenes cada 24 h con un microscopio Olympus CK40 equipado con una cámara Olympus DP12 a un aumento de 40x. La cuantificación de la velocidad del cierre de herida se llevó a cabo con el software ImageJ (NIH) (186).

#### 18.4. Proliferación celular

El medio se renovó 24 h después de sembrar 2000-5000 células según el tipo celular en placas de 96 pocillos, lo que se consideró como día 0, y las células se incubaron 48 h más a 37°C. Tras este tiempo, se renovó el medio y las células se incubaron con 100 µl de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma) a una concentración final de 1 mg/ml en DMEM durante 1 h a 37°C. El medio se retiró cuidadosamente y se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo para romper las células y liberar el colorante. Las lecturas se realizaron a 570 nm en el Varioskan. Todos los experimentos se llevaron a cabo tres veces por duplicado.

En los experimentos de reducción de la proliferación mediante el uso de anticuerpos e inhibidores, la viabilidad celular se representó comparando el anticuerpo anti-FGFR4 con un anti-GST (control) o comparando el efecto de inhibidores específicos con las células sin tratar (100% de proliferación), incubadas en las mismas condiciones y con la misma cantidad del medio (187).

#### 18.5. Apoptosis celular

Para los ensayos de apoptosis,  $3 \times 10^5$  células se sembraron en una placa de 24 pocillos 24 h antes de los tratamientos con 1 mM  $H_2O_2$ , que se mantienen 16 h en medio sin suero. Tras levantar las células con tripsina-EDTA durante 2 min a 37°C, se centrifugaron y resuspendieron en PBS para tener  $1 \times 10^6$  células/ml. 100 µl de la suspensión celular se le añadieron 2.5 µl de anticuerpo frente a Anexina V marcada con FITC (ImmunoStep) por duplicado. Tras incubar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, se añadieron 10 µl de 1 mg/ml ioduro de propidio (Sigma). Tras 5 min a temperatura ambiente en oscuridad, se añadieron 300 µl de 10 mM Hepes a pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $CaCl_2$  (Immunostep) y se analizaron los niveles de apoptosis por citometría de flujo en un equipo CoulterEpics XL (Beckman Coulter).

#### 18.6. Formación de colonias en agar blando

El crecimiento independiente de anclaje se cuantificó mediante la formación de colonias en agar blando (178). Cada p60 se cubrió con 2 ml de la mezcla de agar (DMEM al 10% FBS con 0.6% agar noble). Sobre esta mezcla se añadieron  $7.5 \times 10^4$  células resuspendidas en la mezcla de agar superior (DMEM al 10% FBS con 0.3% agar noble) a cada placa y se dejó gelificar. Se cultivaron las placas durante tres días a 37°C y 5%  $CO_2$ , y se añadió 1.5 ml de la mezcla de agar superior (sin células). Cada semana durante las tres siguientes, se añadió 1.5

ml de DMEM con 10% suero al cultivo. La formación de colonias se monitorizó durante 21 días y las colonias se contaron manualmente a partir de las imágenes tomadas de 25 campos aleatorios diferentes con un microscopio AF6000 LX (Leica-Microsystems).

### 18.7. Ensayo de luciferasa

Los diferentes promotores se obtuvieron mediante PCR del DNA de células 3T3-L1. Los oligonucleótidos se diseñaron para generar fragmentos de aproximadamente 1000 pb. En todos los casos, los oligos hibridan en la posición -700/+297 con respecto al origen de transcripción. Las fragmentos de los promotores amplificados fueron: Trip4 -650/+277, Nr2f6 -700/+269, OsmR -700/+297, Prrx1 -680/+287 y Cbx6 -681/+293. Los fragmentos amplificados contenían en los extremos las dianas de restricción *MluI* y *XhoI* para su clonaje en el vector pGL3-Luc. En la Tabla 10 se detallan los cebadores utilizados.

**Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los promotores de los factores de transcripción desregulados por Snail en ratón**

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
<b>Cbx6</b>	Directo	CGC <u>ACGCGT</u> CATGCCAATGGCAGAGACCAAA
	Reverso	AGACTCGAGTTAGGGCTGGTTGTCCTTCCT
<b>Nr2f6</b>	Directo	CGC <u>ACGCGT</u> CCTCTCCCCTGTAGGCCT
	Reverso	AGACTCGAGCAGGAATATGTTACTTGGGGGAAG
<b>OsmR</b>	Directo	CGC <u>ACGCGT</u> GTGGACATTTTACCATGCAGC
	Reverso	AGACTCGAGCTGGACTGGTGTCCCAGC
<b>Prrx1</b>	Directo	CGC <u>ACGCGT</u> AATACATTGGAGTCCAGGTCA
	Reverso	AGACTCGAGTTCTTTGGCTGCTGGAGA
<b>Trip4</b>	Directo	CGC <u>ACGCGT</u> GACAAAAGCAATCAGCTCAGT
	Reverso	AGACTCGAGCCATCAAACCTCCCACAGC

Los oligonucleótidos subrayados indican la secuencia que forman las dianas de restricción

Los clonajes se verificaron mediante secuenciación. El promotor de la E-cadherina (-178/+92), reprimido por Snail1, se usó como referencia (119, 188). La expresión de luciferasa, medida en términos de unidades de luminiscencia relativa (RLU) se cuantificó con el kit “Luciferase assay system” (Promega) tras 24 h post-transfección usando el lector GloMax (Promega). La expresión de luciferasa en todas las transfecciones se normalizó con el contenido proteico y se expresó como RLU por µg. La cantidad de proteína se cuantificó mediante el 2D-Quant kit.

### 18.8. Diferenciación adipocítica en la línea 3T3-L1

Para la diferenciación adipocítica, las células 3T3-L1 se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en placas p60 y se mantuvieron en cultivo tres días. La diferenciación se indujo tras 48 h post confluencia añadiendo el cóctel de diferenciación compuesto de 0.5 mM isobutilmetilxantina, 2 mM dexametasona y 1.7 mM insulina. Este cóctel se sustituyó a los dos días por DMEM con 10% de suero con 1.7 mM de insulina, renovando el medio cada tres días. Para la tinción de Oil Red O, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 3.7% formaldehído durante 1 h a temperatura ambiente. La tinción de las gotas lipídicas se realizó con una solución de Oil Red O (1.8 mg/ml en 60% isopropanol) durante 1 h. La solución se retiró con agua y se dejó secar para tomar las imágenes de la placa. Para realizar las mediciones colorimétricas se disgregaron las células con isopropanol y la absorbancia se midió a 500 nm en un espectrofotómetro Genequant (GE Healthcare).

Para los tratamientos con el anticuerpo anti-IL-17 (R&D Systems), éste se añadió al medio de cultivo a una concentración de 500 ng/ml cada dos días durante la diferenciación.

### 19. Xenotransplantes tumorales

El comité ético del CSIC aprobó los protocolos usados para la experimentación animal de acuerdo a las normas de experimentación y bienestar animal. Para los experimentos de xenotransplantes tumorales se utilizaron ratones inmunodeprimidos *Swiss "nude"* (Charles River).

Para generar tumores subcutáneos de las células con FGFR4 silenciado, se inyectaron  $1 \times 10^7$  células SW48 transfectadas estables en el flanco derecho en 0.2 ml de PBS conteniendo 20% matrigel. En el caso de PIM1 y sus mutantes, se inyectaron en cada flanco del ratón  $2.5 \times 10^6$  células KM12L4 transfectadas transitoriamente con PIM1 en 0.2 ml de PBS con 0.1% glucosa. Los tamaños de los tumores se midieron cada dos días. El volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) se determinó mediante un calibre y aplicando la siguiente fórmula:  $1/2 (\text{ancho}^2 \times \text{largo})$ . Cada animal se sacrificó usando cámaras de  $\text{CO}_2$  siguiendo las normas éticas de la guía "Human End points for Animal Use in Biomedical Research (HEP)".

### 20. Array de citoquinas

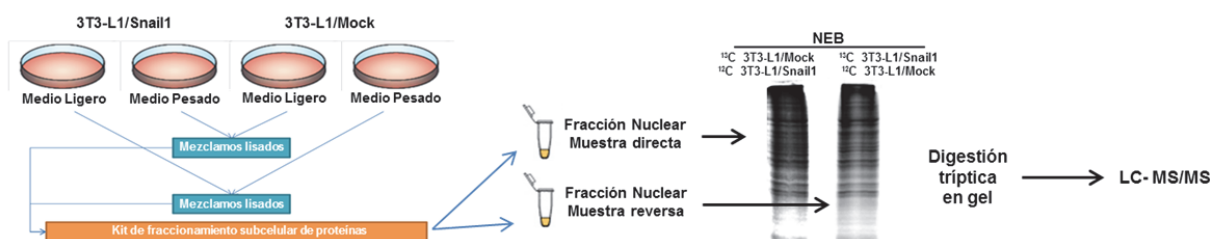
Los medios condicionados libres de suero de las células 3T3-L1 y mMSC (células transfectadas Snail1 y control) se recogieron a las 48 h y se incubaron con el array de

citoquinas de ratón “Mouse Cytokine Array C3” (RayBiotech) durante toda la noche a 4° C. Este array contiene impresos 62 anticuerpos específicos para citoquinas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se escanearon y se analizaron mediante el software Redfin de análisis de geles 2D (Ludesi) (178). Las intensidades relativas de las citoquinas se normalizaron y compararon con los puntos control de la misma membrana y se representaron en unidades arbitrarias.

## 21. Análisis proteómico

### 21.1. Marcaje metabólico SILAC de las células 3T3-L1 y preparación de los extractos nucleares

Para el marcaje metabólico, las células 3T3-L1/Snail1 y 3T3-L1/control se crecieron bien en DMEM que contenía los aminoácidos normales o ligeros (L-lisina y L-arginina) o en medio con los isótopos pesados [ $^{13}\text{C}_6$ ]-L-lisina y [ $^{13}\text{C}_6$ ]-L-arginina (Dundee Cell Products) con un 10% de suero dializado, 100 unidades/ml de penicilina/ estreptomicina y 0.5 mg/ml de G418 a 37°C 5%  $\text{CO}_2$  (Figura 14). Se realizaron ocho duplicaciones para permitir alcanzar >97% de la incorporación de los aminoácidos pesados, calculamos esta incorporación siguiendo la metodología descrita previamente (189). Este cálculo se realizó tras el análisis del extracto proteico de las células que han crecido únicamente en el medio con isotopos pesados. Por análisis en el espectrómetro de masas, se calculó el porcentaje de péptidos que presentan las envolturas isotópicas correspondientes al marcaje frente al total de péptidos identificados. Se realizaron experimentos de marcaje directo e inverso como replicado biológico y técnico, para evitar sesgos relacionados con el marcaje.



**Figura 14. Esquema de la metodología seguida en el marcaje metabólico de las células 3T3-L1 transfectadas con Snail1.** Representación esquemática de los experimentos llevados a cabo para el marcaje SILAC de las líneas 3T3-L1 Snail1 y control en medio ligero o pesado con DMEM suplementado con 10% FBS dializado y los respectivos aminoácidos.

Para la obtención de los extractos nucleares, se lavaron las células con PBS, se resuspendieron en 4 mM EDTA-PBS y se centrifugaron a 500g durante 5 min. Se utilizó el kit de fraccionamiento subcelular (Pierce) que nos permite obtener las distintas fracciones (membrana, citoplasma o núcleo) de las células. Las proteínas de la fracción nuclear se cuantificaron utilizando el método basado en la fluorescencia del triptófano presente en la muestra, con una modificación del protocolo descrito por Wisniewsky (190), donde se usa una longitud de onda de excitación de 295(5) nm y una longitud de onda de excitación de 350(20) nm. Esta modificación reduce la fluorescencia emitida por tirosina y permite una cuantificación más precisa. Finalmente, 25 µg de cada extracto nuclear se mezclaron en una proporción 1:1 y se separaron en un gel monodimensional SDS-PAGE al 12.5 % con un amperaje constante de 25 mA. Los geles se tiñeron con azul de coomassie coloidal y se cortaron 18 bandas de cada carril. Cada banda se cortó a su vez en pequeñas fracciones y se eliminó el azul de coomassie con bicarbonato amónico/acetonitrilo (ACN) al 50%, deshidratando con ACN y secando en el concentrador de vacío SpeedVac (Eppendorf). Las bandas se rehidrataron con 12.5 ng/µl de tripsina (Promega) en 50 mM de bicarbonato amónico y la mezcla se incubó durante toda la noche con ligera agitación a 37°C en ThermoMixer (Eppendorf). Los péptidos se extrajeron usando 0.5% ácido trifluoroacético (TFA) en ACN, se secaron y se limpiaron utilizando Zip Tip con 0.6 µl de resina C18 (Millipore). Las muestras se reconstituyeron en 5 µl de 0.1% ácido fórmico y 2% ACN antes de realizar su análisis mediante espectrometría de masas.

### **21.2. Espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de proteínas con SILAC**

Tras atrapar los péptidos en una columna C18-A1 ASY (ThermoScientific), se eluyeron en una columna C18 Biosphere (10 cm de longitud, 75 µm de diámetro y 3 µm de tamaño de partícula). Los péptidos se separaron en un gradiente de 180 min de 0-35% de Buffer B (Buffer A: 0.1% ácido fórmico/2% ACN; Buffer B: 0.1% ácido fórmico en ACN) con una velocidad de flujo de 300 nl/min en un nanoEasy HPLC (Proxeon) acoplado a una fuente iónica con nano-electrospray (Proxeon). Los espectros de masas se adquirieron en un espectro de masas LTQ–Orbitrap Velos (Thermo-Scientific) trabajando en modo positivo. Los espectros de masas correspondientes al espectro de barrido completo (m/z 400-1200) se obtuvieron con una resolución de 60.000 y se seleccionaron los 15 iones más intensos para su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) en la trampa iónica, con la energía de colisión normalizada al 35%. Los iones con carga única o sin asignación de carga se desecharon. Se llevó a cabo una exclusión dinámica con una duración de 30 s.

Los archivos de espectros (\*.raw) se enfrentaron a la base de datos SwissProt 57.15 (16230 secuencias) de ratón usando el motor de búsqueda de MASCOT v2.3 (MatrixScience) a través de ProteomeDiscoverer (versión 1.4.1.14) (Thermo). En los parámetros de búsqueda, la carbamidometilación de cisteínas y la oxidación de metionina se establecieron como modificaciones fijas. Como modificaciones variables se seleccionaron la acetilación N-terminal y la presencia de isótopos pesados  $^{13}\text{C}_6$ -Arg y  $^{13}\text{C}_6$ -Lys. La tolerancia de la selección de los precursores y los iones producto se fijó en 10 ppm y 0.8 Da, respectivamente. La identificación de los péptidos se validó mediante el algoritmo Percolator usando un valor  $q \leq 0.01$  (191). Para la cuantificación de cada pareja de péptidos SILAC, el software Proteome Discoverer determina el área de los cromatogramas iónicos y calcula un ratio entre las dos envolturas isotópicas correspondientes a los péptidos pesado y ligero. El cálculo del ratio correspondiente a la proteína se calcula como la media aritmética de los péptidos únicos identificados y cuantificados. Las proteínas se cuantificaron con, al menos, un péptido en ambos experimentos (directo y reverso).

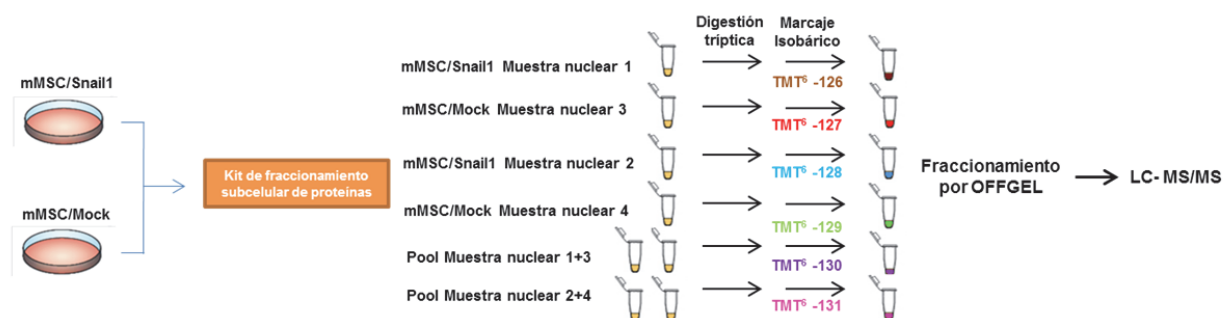
Los ratios calculados de las proteínas correspondientes a las muestras pesadas y ligeras se usaron para determinar alteraciones en la abundancia. Para el cálculo del cambio significativo para las proteínas desreguladas se utilizó un test basado en la permutación de los péptidos cuantificados que se ha descrito previamente como el más adecuado para los experimentos tipo SILAC (192). Las proteínas identificadas con una variabilidad  $>20\%$  se revisaron manualmente para verificar que tanto la envoltura isotópica de las formas pesadas y ligeras como la cantidad de picos identificados en esa envoltura eran correctos. Para la normalización de los datos, se utilizó la media truncada al 5% para centrar la tendencia de todos los ratios de las proteínas cuantificadas en torno a 0. Para calcular la media truncada se eliminaron los valores extremos ( $\pm 2.5\%$  del total sobreexpresado y reprimido), se calculó la media y se usó este valor para normalizar todos los valores, minimizando los efectos de los valores extremos que pueden producir un desplazamiento de la curva gaussiana de los ratios de las proteínas. También se consideró el efecto que pueden producir las alteraciones en la cuantificación debido a la conversión arginina-prolina, que difiere entre distintos tipos celulares, así se investigó la tasa de la conversión arginina-prolina en la línea 3T3-L1 usando como modificación variable la presencia de prolina pesada en la búsqueda. Se detectó que menos del 1% de proteínas presentaban la forma pesada de la prolina en las células marcadas. Por tanto, no había ningún efecto sobre la cuantificación.



Los datos del experimento SILAC con las células 3T3-L1 se encuentran depositados en el repositorio público PRIDE con el número de identificación PXD001529 dentro del consorcio ProteomeXchange (193).

### 21.3. Marcaje isobárico por TMT de las mMSC y análisis LC-MS/MS

Las células MSC/Snail1 y MSC/control se crecieron en DMEM con 10% de suero hasta alcanzar 100% de confluencia, se renovó el medio y se mantuvieron 48 h post-confluencia. Para obtener las proteínas nucleares, se lavaron las células con PBS, se resuspendieron en 4 mM EDTA-PBS y se centrifugaron a 500g durante 5 min. Para obtener la fracción nuclear se utilizó el mismo kit de fraccionamiento subcelular que para las células 3T3-L1. Se cuantificaron las proteínas nucleares mediante el método del triptófano y 25 µg de extracto proteico de cada muestra (se hace un replicado biológico de cada condición con sobreexpresión de Snail1 y control) se disolvieron en 33 µl de 0.1 M bicarbonato de trietilamonio (TEAB) en 6 M urea. Las proteínas se redujeron con 2 µl de 50 mM Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) y se alquilaron con 1 µl de 0.4 M iodoacetamida. Finalmente, añadimos tripsina a una concentración de 10 µg/mg de proteína, y la mezcla se incubó durante toda la noche en ligera agitación y a 37°C. En paralelo, se mezclaron las muestras nucleares de ambos replicados biológicos para la misma condición (Snail1 y mock). Ambas mezclas son controles técnicos que no deben presentar ningún cambio de intensidad con respecto a las muestras individuales marcadas de su misma condición (Figura 15). Al día siguiente, los péptidos de las cuatro muestras y ambas mezclas o pools se marcaron de manera individual con seis reproteros diferentes TMT (TandemMassTags, ThermoScientific). El contenido de los seis tubos se juntó y desaló usando la columna de centrifugación Vidac C18 (Harvard apparatus). La muestra se secó en SpeedVac antes de realizar el fraccionamiento por OFFGEL, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (Agilent). La muestra seca se reconstituyó en tampón de enfoque (5% glicerol, 2% IPG buffer pH 3.0-10 (GE Healthcare)) y se cargó en tiras de isoelectroenfoco de 12 pocillos (13 cm ImmobilineDryStrip, pH 3.0-10 (GE Healthcare)). Las fracciones recuperadas del OFFGEL se desalaron como anteriormente y se secaron en SpeedVac.



**Figura 15. Esquema de la metodología seguida para el marcaje isobárico de células mMSC transfectadas con Snail1.** Representación esquemática de los experimentos proteómicos llevados a cabo para el marcaje metabólico de las células mMSC Snail1 y control, tras digestión triptica y marcaje mediante TMT 6 plex.

La espectrometría de masas se llevó a cabo en un LTQ-Orbitrap Velos equipado con un nanoUPLC Acquity (Waters). Los péptidos se atraparon en una precolumna Magic C18 AQ (Michrom) (200 Å 0.1 x 20 mm de diámetro) y se separaron en una columna Magic C18 AQ (Michrom) (100 Å 0.75 x 150 mm de diámetro). La separación analítica se llevó a cabo con un gradiente de 65 min que modifica las concentraciones del buffer como sigue: 0–1 min 95% A (0.1% ácido fórmico) y 5% B (0.1% ácido fórmico en ACN), seguido de 65% A y 35% B hasta el min 55, y 20% A y 80% B hasta el min 65, con una velocidad de flujo de 220 nl/min. Para la obtención de los espectros de masas, la resolución del Orbitrap se fijó en 60.000 con una ventana desde 400 a 2000 m/z. Un máximo de tres precursores se seleccionaron para CID en el LTQ y HCD para el análisis en el Orbitrap. La normalización de la energía de colisión se fijó a un 35% para el CID y un 60% para HCD. Con los archivos de los espectros de masas (\*.raw) se generó una nueva lista en la cual los espectros obtenidos por CID y HCD se mezclaron para obtener simultáneamente la identificación y cuantificación. Para ello usamos el software ([http://www.expasy.org/tools/HCD\\_CID\\_merger.html](http://www.expasy.org/tools/HCD_CID_merger.html)) presente en el repositorio de Expasy. El archivo generado combinando las doce fracciones de OFFGEL analizadas se enfrentó contra la base de datos de ratón SwissProt 57.15 (16230 secuencias) usando el motor de búsqueda Phenix (Genebio). La tolerancia para el ion parental se fijó en 10 ppm y 0.5 Da para los iones producto.

Estos experimentos con las líneas mMSC se realizaron en la facultad de Medicina de la Universidad de Ginebra (Suiza), con la supervisión del Dr. Jean Charles Sánchez.

#### 21.4. Análisis por LC-MS/MS de la inmunoprecipitación de FGFR4

Para la inmunoprecipitación de FGFR4 se lisaron las células con GST-FISH (1% Igepal, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol en 50 mM Tris–HCl pH 7.5) y se realizó la incubación

del lisado con un anticuerpo policlonal de FGFR4 (SCBT). Los inmunocomplejos se capturaron con 100  $\mu$ l de Proteína G sefarosa (Sigma). Después de lavar, las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE para análisis por espectrometría de masas. Se realizó la digestión en gel y el estudio de las identificaciones por nanoLC-MS/MS en un LTQ-Orbitrap Velos como en el apartado 15.2. El análisis de los espectros se realizó a través del motor de búsqueda SEQUEST con ProteomeDiscoverer (1.4.1.14). Los parámetros de búsqueda se fijaron a una tolerancia de 10 ppm para el ion precursor y de 0.8 Da para los iones fragmentos. Los péptidos identificados se validaron usando Percolator con un  $q < 0.01$ . Las proteínas se filtraron con el anticuerpo control y eliminando las que aparecen de manera redundante (>20 experimentos) en la base de datos Crapome, que recoge los contaminantes más comunes que aparecen en experimentos de purificación mediante afinidad e identificación mediante espectrometría de masas (194).

### 21.5. Herramientas bioinformáticas

Para el análisis de las secuencias genéticas de FGFR4 y PIM1 se recurrió a la base de datos Ensembl, donde se recoge la información genética completa de numerosas especies. Con Ensembl se puede acceder fácilmente a la información sobre las distintas isoformas que presenta el gen de interés, alteraciones genéticas o su relación con diferentes patologías (195). Además, mediante Ensembl se realizaron los análisis de la frecuencia de los SNP identificados en FGFR4 y PIM1 dentro del proyecto “1000 genomas”. Este proyecto contiene la información genética completa de 2500 muestras diferentes y describe las alteraciones presentes en, al menos, el 1% de las muestras analizadas (196). Además hemos obtenido información complementaria de la base de datos Genecards del instituto de ciencias Weizmann que aporta información tanto a nivel genético, transcriptómico o proteómico de todos los genes descritos o predecidos en el ser humano(197).

La expresión relativa de los genes FGFR4 y PIM1, tanto a nivel de mRNA como proteína, se obtuvo de la base de datos Oncomine, que recoge información de múltiples experimentos de expresión de mRNA mediante *microarrays* (198, 199), y del Human Protein Atlas que contiene datos de inmunohistoquímica para diferentes anticuerpos de la misma proteína en diferentes tejidos normales y patológicos (200). Otra base de datos interesantes es cBioportal, que presenta de una manera gráfica y accesible los datos experimentales de estudios de secuenciación masiva y/o expresión de mRNA o proteína en distintos tipos tumorales obtenidos por el consorcio “The Cancer Genome atlas” (TCGA) (201).

El análisis *in silico* de la estructura de PIM1 y los cambios que producen las mutaciones descritas se ha realizado utilizando el programa Site Directed Mutator (SDM) (202). Este programa permite estudiar la estabilidad proteica tras la sustituciones de aminoácidos y las modificaciones fisicoquímicas producidas en el entorno de la proteína mediante la comparación con una base de datos experimentales para más de 1300 estructuras diferentes.

Para el estudio de los sitios potenciales de unión del factor de transcripción Snail1 en distintos promotores, se recurrió al programa MatInspector, que contiene los algoritmos e información necesaria para determinar la presencia de motivos de unión en los promotores de interés. El programa MatInspector se encuentra dentro de un paquete de programas científicos conocidos como Genomatix (<http://www.genomatix.de/matinspector.html>) (203). Para validar los datos obtenidos en MatInspector recurrimos a la base de datos “Transcriptional Regulatory Element Database” (TRED), que presenta información para numerosos promotores en mamíferos, indicando los elementos de regulación presentes (204).

Las proteínas identificadas y cuantificadas en los estudios de proteómica se analizaron mediante biología de sistemas usando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Qiagen) con el fin de obtener la predicción de las funciones biológicas y el análisis de las interacciones proteicas. La base de datos de IPA se actualiza periódicamente y contiene las interacciones publicadas en la literatura científica entre diferentes proteínas. IPA utiliza esta base de datos para la construcción de grupos de proteínas que representan interacciones directas e indirectas, interacciones físicas y vías de señalización celular. Por otra parte, el programa DAVID se utilizó para evaluar el enriquecimiento subcelular en las muestras nucleares extraídas de las líneas celulares 3T3-L1 y mMSC (205).

## **22. Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos en los ensayos celulares, excepto donde se indique, se realizaron utilizando Microsoft Excel (Microsoft Office). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes y, al menos, por duplicado. Para la evaluación de la significancia estadística entre grupos, se utilizó la prueba t de Student. En todos los análisis estadísticos se consideraron significativos los p-valores inferiores a 0.05 en la prueba de dos colas.



## **RESULTADOS**



## **23. Análisis genético y funcional de los antígenos asociados a tumor: FGFR4 y PIM1**

Mediante el cribado con microarrays de proteínas nuestro grupo había analizado la respuesta humoral frente a proteínas tumorales en pacientes con CCR. En los trabajos que conforman el primer bloque de esta Tesis Doctoral, se evaluaron los niveles de expresión y la posible presencia de alteraciones genéticas en los genes de dos AAT (FGFR4 y PIM1) en muestras de tejido pareadas (normal/tumoral) como base de la inducción de autoanticuerpos en estos pacientes. Por otra parte, se estudió la posible implicación de estas proteínas y de sus potenciales mutaciones en el proceso neoplásico de colon mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

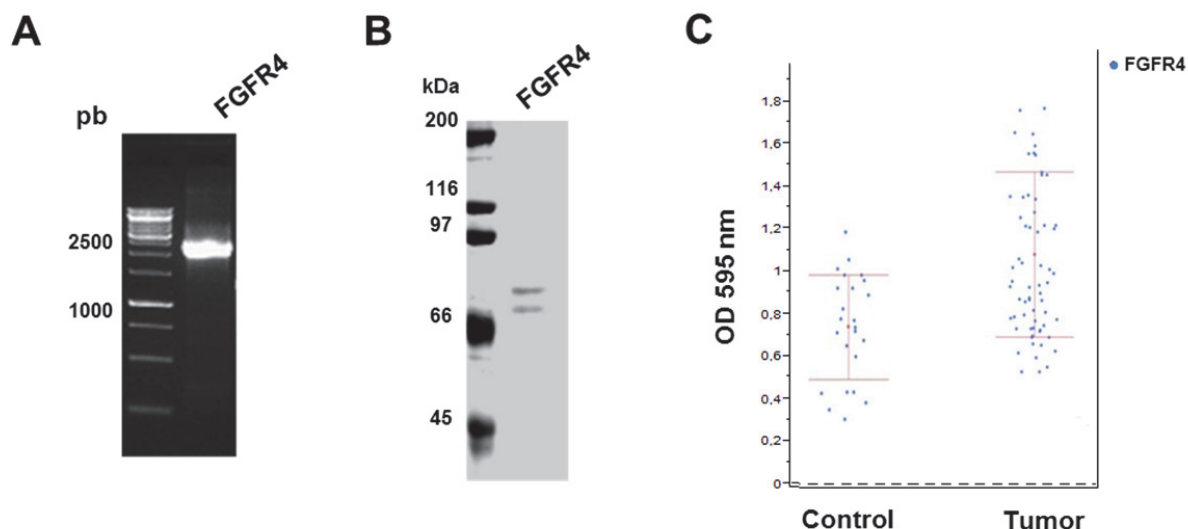
### **23.1. FGFR4**

#### **23.1.1. Los pacientes con CCR desarrollan autoanticuerpos frente a FGFR4**

En primer lugar, se verificó la respuesta humoral a FGFR4 en pacientes de los que disponíamos tanto de suero como de tejido normal y tumoral pareado que se utilizó posteriormente para analizar la secuencia del gen codificante de FGFR4. Para ello, se utilizaron proteínas expresadas en bacteria en un ensayo de ELISA. El cDNA codificante para FGFR4 se amplificó por PCR (Figura 16A), se subclonó en el vector pET28a, que permite expresar la proteína fusionada a una cola de histidinas, y se transformó en las células BL21 DE3 de *E. coli*. Los niveles de expresión de FGFR4 fueron de 0.25 mg/litro de proteína, con un grado de pureza superior al 90% (Figura 16B).

Finalmente, se testaron los sueros de 40 pacientes con CCR y 25 sueros de individuos control para FGFR4 mediante ELISA (Figura 16C). Los resultados del ELISA mostraron que la inmunorreactividad frente a FGFR4 era significativamente mayor en sueros de pacientes (media = 1.054, 95% IC: 0.68-1.54, p-valor <0.001) que en sujetos control (media = 0.745, 95% IC: 0.42-1.41, p-valor <0.003). Estos datos confirman los resultados obtenidos anteriormente (73). Por tanto, procedimos a evaluar las potenciales alteraciones genéticas de FGFR4 en CCR que pudiesen ser responsables de la producción de autoanticuerpos.





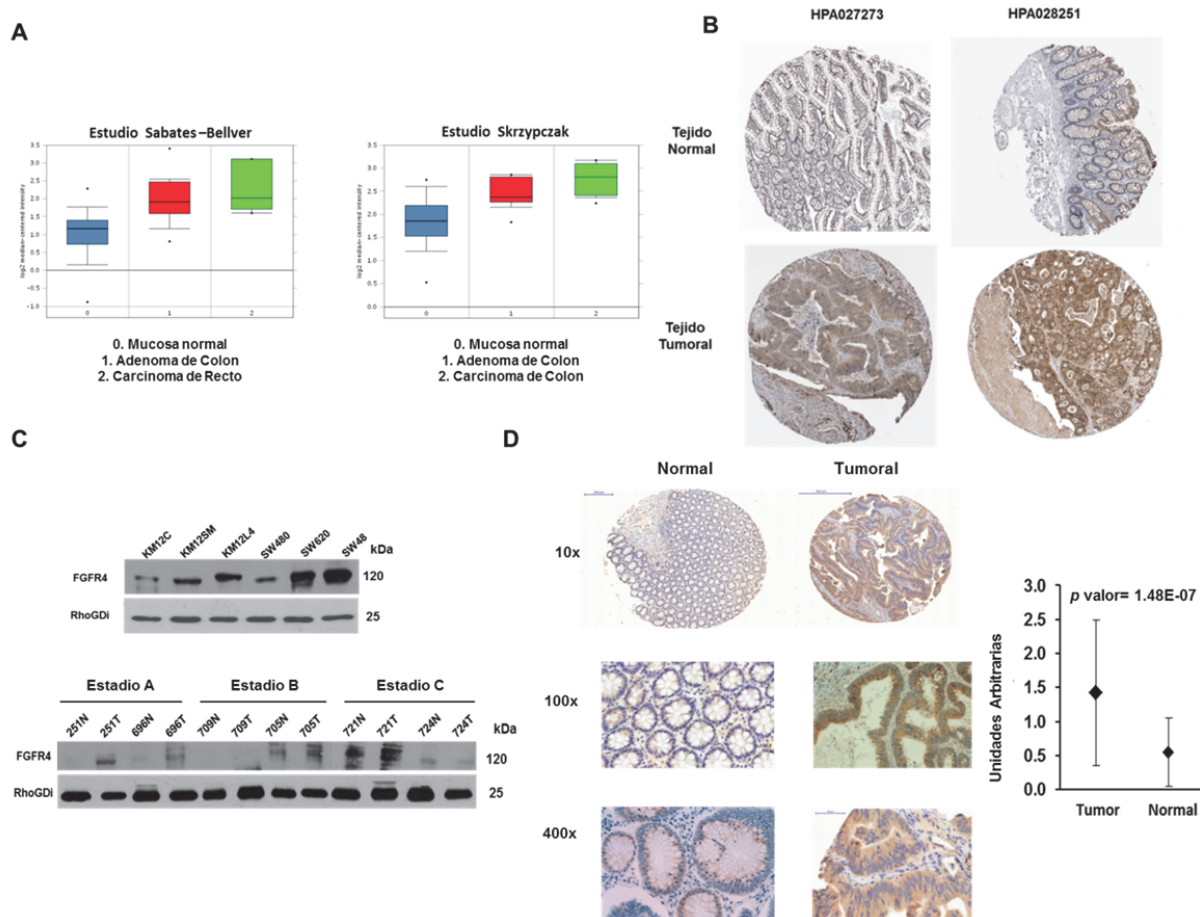
**Figura 16. Análisis de FGFR4 como AAT en los pacientes seleccionados.** A) El producto de amplificación de FGFR4 por PCR se cargó en un gel de agarosa al 2% en TAE en presencia de Gel Red. B) FGFR4 tras su purificación se cargó en un gel de SDS-PAGE del 10% y se tiñó con Azul de Coomassie. C) Valores de ELISA para FGFR4 obtenido con sueros de pacientes con CCR y control procedentes del Hospital Puerta de Hierro (Madrid) y Hospital de Cabueñes (Gijón).

### 23.1.2. FGFR4 aparece sobreexpresado en líneas celulares y tejidos de CCR

En primer lugar se realizó un meta-análisis de los niveles de expresión de FGFR4 a nivel de mRNA utilizando la base de datos “Oncomine” (198, 199) y de la proteína utilizando datos de inmunohistoquímica (IHQ) del Human Protein Atlas (HPA) (200).

Con la base de datos Oncomine (estudios de Sabates-Bellver (206) y de Skrypczak (207), se analizaron los niveles de expresión de FGFR4 en mucosa normal, adenoma y adenocarcinoma de colon o recto (Figura 17A). Se observó que los niveles de mRNA de FGFR4 eran claramente superiores en tejido de adenocarcinoma de colon, respecto de mucosa normal y adenoma de colon. Por otra parte, en Human Protein Atlas, se observó una sobreexpresión de FGFR4 en tejido de pacientes con CCR en más del 80% de los tejidos analizados respecto de tejido normal mediante IHQ con dos anticuerpos diferentes (HPA027273 y HPA028251) (Figura 17B).

Para verificar estos datos, se llevó a cabo un análisis por WB de distintas líneas celulares de CCR con distintas capacidades metastásicas y de extractos de tejido pareado normal/tumoral de pacientes con diferente estadio de desarrollo tumoral (Figura 17C). Se detectó que la expresión de FGFR4 era claramente superior en líneas celulares metastásicas. En tejido, observamos mayores niveles de FGFR4 en el tejido tumoral frente al normal, pero sin asociación con ningún estadio del cáncer.



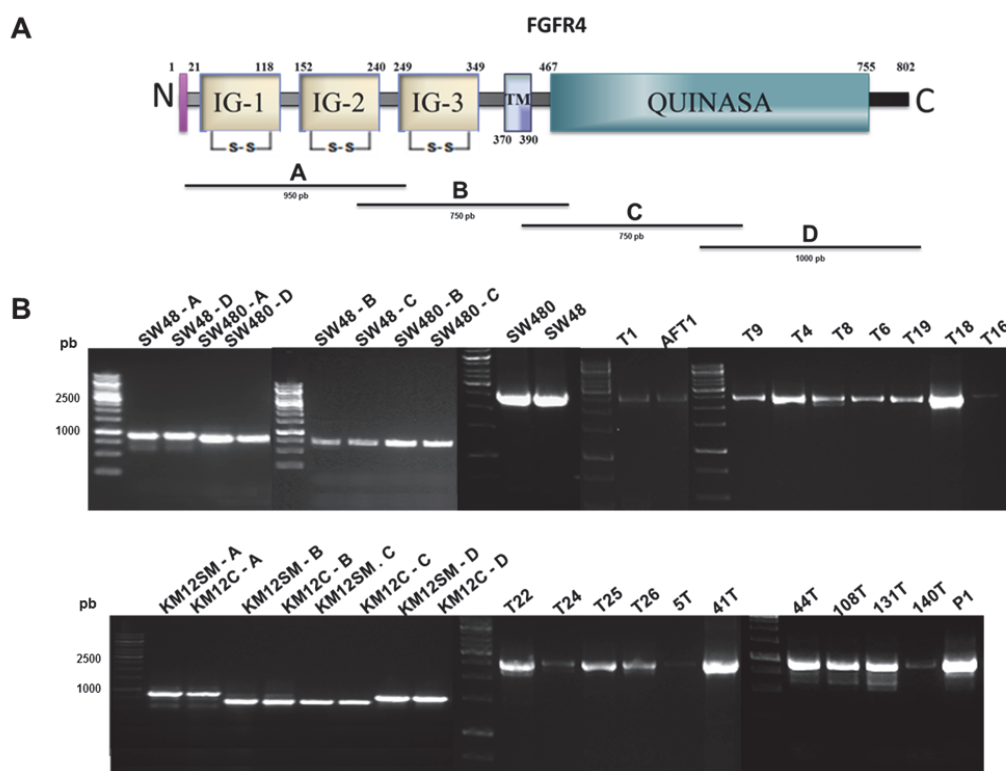
**Figura 17. Análisis de los niveles de expresión de FGFR4 en CCR.** A) Los niveles relativos de expresión génica de FGFR4 se analizaron mediante meta-análisis con la base de datos Oncomine. Se analizaron dos estudios y en ambos se observó un aumento de la expresión de FGFR4. B) Se analizaron dos anticuerpos distintos de la base de datos Human Protein Atlas que mostraron un aumento significativo de expresión de FGFR4 en tejido tumoral de CCR. C) WB de FGFR4 en líneas de CCR y en muestras tumorales pareadas. Se utilizó tubulina como control de carga. D) TMA de tejido tumoral y mucosa normal. Las imágenes se tomaron a distintos aumentos. La expresión de FGFR4 se cuantificó con el siguiente criterio: 1. Tinción baja; 2 tinción normal; 3 tinción fuerte. Se muestra la mediana  $\pm$  desviación estándar y el p-valor.

Mediante la IHQ de un TMA de tejido tumoral y mucosa normal distal de 65 pacientes con CCR, encontramos una sobreexpresión de FGFR4 en tejido tumoral ( $1.42 \pm 1.06$ ) con respecto al tejido normal pareado ( $0.54 \pm 0.5$ ) estadísticamente significativa ( $p$ -valor  $1.48 \times 10^{-7}$ ). FGFR4 se localizó principalmente en células epiteliales de CCR, sin un incremento significativo de expresión en el estroma tumoral (Figura 17D). Estos datos, nos indican que FGFR4 se expresa en altos niveles en líneas celulares de CCR, sobretudo en las líneas metastásicas KM12SM y SW620, y en tejido tumoral. En los tejidos, la expresión de FGFR4 es fundamentalmente tumoral y mayor en los estadios tardíos.

### 23.1.3. El análisis genético de FGFR4 revela la presencia de polimorfismos comunes en líneas celulares y tejido de CCR

A continuación, se procedió a investigar la presencia de mutaciones en el gen de FGFR4, tanto en líneas de cáncer colorrectal como en tejido de pacientes de CCR. Para ello, se aisló el RNA total de las muestras de los mismos pacientes utilizados anteriormente y se sintetizó su cDNA, para determinar la presencia de mutaciones.

Antes de proceder al análisis de los tejidos, las líneas tumorales SW480, SW48, KM12C y KM12SM se utilizaron para optimizar el proceso de secuenciación de FGFR4, ya que debido al tamaño del cDNA requería de 4 reacciones de PCR por muestra (Figura 18A) y, determinar en qué líneas celulares convendría realizar los ensayos funcionales. La amplificación de los productos requirió 30 ciclos de PCR (Figura 18B). Tras optimizar el proceso, conseguimos amplificar los 4 fragmentos de PCR a la misma temperatura y número de ciclos. Los productos de PCR se secuenciaron directamente.



**Figura 18. Análisis mutacional de FGFR4 en líneas celulares y tejido de cáncer colorrectal.** A) Esquema de los fragmentos que se amplificaron por PCR para la secuenciación directa de FGFR4. B) PCRs de las líneas celulares y de los tejidos tumorales de los pacientes de CCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante la amplificación de los fragmentos indicados, o amplificando por PCR el mensajero completo y secuenciando el mensajero por fragmentos.

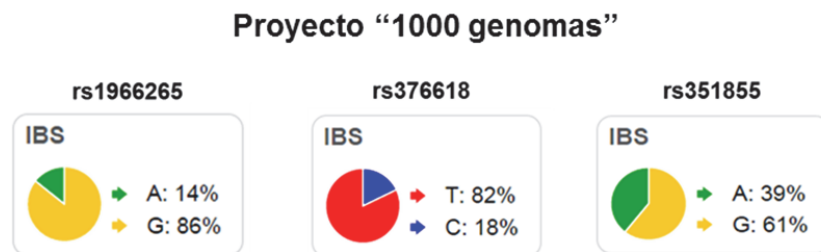
Se identificaron varios polimorfismos de nucleótido único “single nucleotide polymorphism (SNP)” en las cuatro líneas de CCR analizadas (Tabla 11), aunque ninguno se encontraba en el dominio tirosín quinasa. Dos de las tres mutaciones se encontraban en el dominio extracelular y la otra modificaba una valina por una isoleucina en la posición 10 del péptido señal. En las líneas KM12 se encontró también el polimorfismo rs351855 que produce un cambio de glicina por arginina en la posición 388 (Gly388Arg). Este SNP se asocia a un mayor riesgo de desarrollar cáncer, y a un mal pronóstico en cáncer de mama, próstata, colorrectal y escamoso de cabeza y cuello (172, 208, 209).

A continuación, se realizó la amplificación y secuenciación de FGFR4 en veinte muestras de tejido tumoral de pacientes con CCR (Figura 18B), encontrando las mismas mutaciones presentes en las líneas celulares (Tabla 11).

**Tabla 11. Mutaciones encontradas en FGFR4 en las líneas celulares y en los pacientes de CCR analizados.**

MUTACIÓN	MUTACIÓN MENSAJERO	MUTACIÓN PROTEÍNA	PACIENTES	FRECUENCIA EN PACIENTES	LINEAS CELULARES	PUBLICADA
SNP rs1966265	G195A	Val10Ile	108T, T8, T19	15 %	SW48, KM12	Si
SILENCIOSA	A329C	-	AF1T, T8, T9, T18, T19, T22	30%	-	Si
SNP rs376618	C577T	Pro136Leu	108T, AF1T, T1, T8, T9, T16, T19, T22, T24, T25, T26	55%	SW48, SW480, KM12	Si
SILENCIOSA	G869A	-	5T, 41T, 44T, AF1T, T1, T4, T6, T8, T9, T18, T19, T22, T24, T25, T26	75%	-	Si
SNP rs351855	G1329A	Gly388Arg	41T, 44T, 109T, T1, T4, T6, T8, T9, T19, T22, T24, T26	60%	KM12	Si

La prevalencia de los polimorfismos que encontramos en los pacientes fue del 15% para rs1966265, 55% para rs376618 y 60% para rs351855. El polimorfismo rs1966265 (Val10Ile) presenta una prevalencia similar a la descrita en el proyecto “1000 genomas” (210) para la población ibérica (Figura 19). Para rs376618 (Pro136Leu) se observa un 27% menos de presencia del polimorfismo presente en esta población. La alteración rs351855 presenta una prevalencia de un 20% más de dicha mutación en pacientes de CCR con respecto a la población ibérica, lo que sugiere que dicha mutación puede predisponer a un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal (211, 212). Aparte de estos polimorfismos, no identificamos otras alteraciones genéticas importantes en FGFR4.



**Figura 19. Frecuencia de los SNPs descritos en FGFR4 en el proyecto de los 1000 genomas.**

En vista de los resultados obtenidos, se concluyó que la principal razón para la inducción de autoanticuerpos por FGFR4 en CCR se debe a su sobreexpresión y no a la presencia de alteraciones genéticas.

#### **23.1.4. El silenciamiento de FGFR4 disminuye la capacidad tumorigénica en las líneas celulares de CCR**

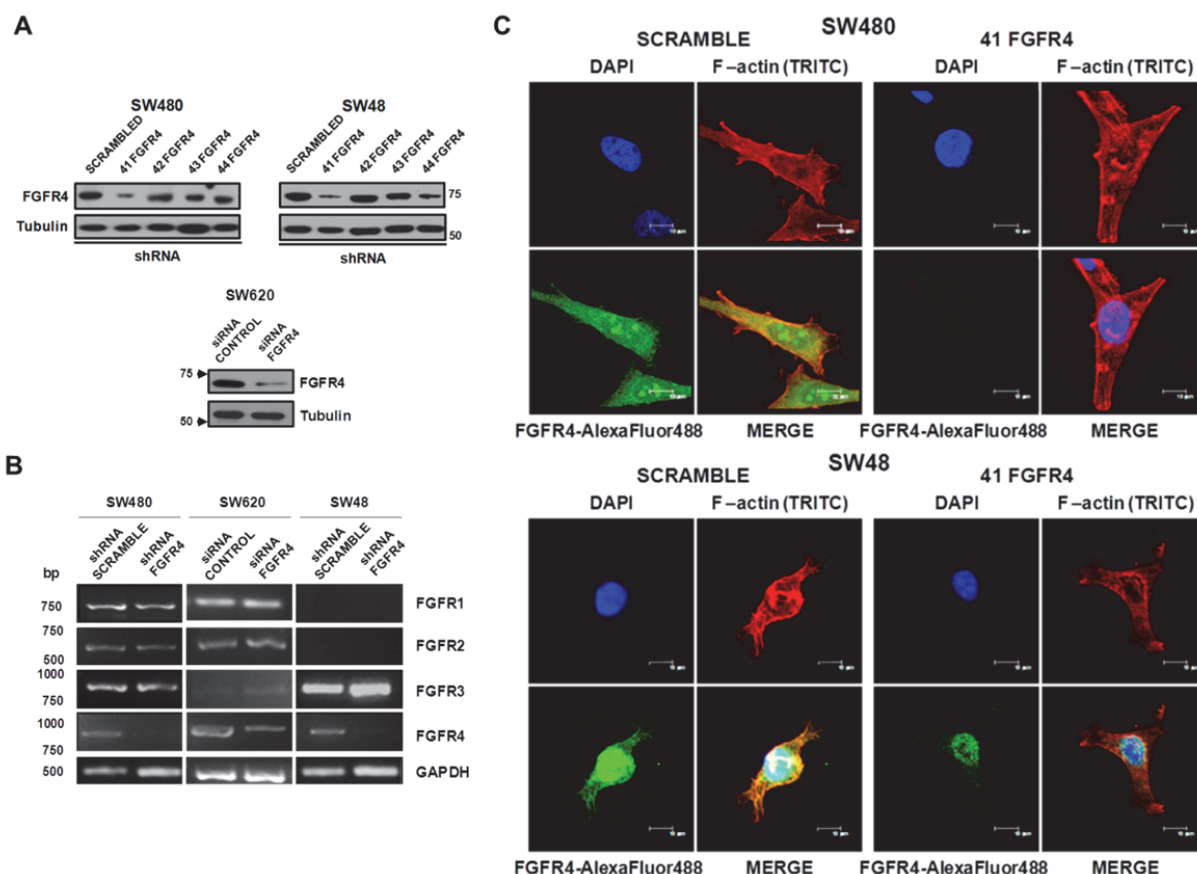
Para determinar el efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en el desarrollo de CCR, procedimos a silenciar FGFR4 en aquellas líneas celulares de CCR que carecían de alteraciones genéticas o del polimorfismo rs351855, y que presentaban variaciones en la expresión proteica de FGFR4. Utilizamos células SW480, con un nivel intermedio de expresión de FGFR4 y poca capacidad metastásica, y células SW620 y SW48 con altos niveles de expresión y gran capacidad metastásica.

##### **23.1.4.1. Silenciamiento de FGFR4 en líneas celulares mediante transfección estable o transitoria**

El silenciamiento de FGFR4 en las líneas SW480 y SW48 se realizó mediante transfección estable con cuatro shRNAs que reconocen distintos exones de FGFR4. Como control se utilizó un shRNA scramble que no reconoce ningún gen. Para la línea SW620 se utilizó un silenciamiento transitorio con un siRNA específico de FGFR4 (Figura 20A).

El shRNA #41 ocasionó mayor inhibición de la expresión de FGFR4, tanto a nivel de proteína como a nivel de mRNA, que los otros 3 shRNAs (Figura 20A). El silenciamiento obtenido con siRNA en las células SW620 fue similar al obtenido con shRNAs. Para excluir que el silenciamiento de FGFR4 produjera alguna alteración en los otros miembros de la familia de receptores se evaluó, mediante RT-PCR, los niveles de mRNA para FGFR1, FGFR2 y FGFR3.

No se observaron cambios de expresión por efecto de la inhibición de FGFR4 en otros receptores, lo que confirmaba la especificidad del silenciamiento (Figura 20B).



**Figura 20. Silenciamiento de FGFR4 en líneas celulares.** Cuatro shRNAs dirigidos frente a diferentes exones de FGFR4 y un control (scramble) se utilizaron para obtener una transfección estable en las células de CCR después de la selección con puromicina. Por otra parte, se utilizó una transfección transitoria con siRNA para el silenciamiento de FGFR4 en la línea SW620. A) Análisis por WB de FGFR4 en las células SW480, SW48 y SW620. Se utilizó tubulina como control de carga. B) Análisis por PCR semi-cuantitativa de FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 usando primers específicos en las tres líneas celulares. Se utilizó como control de carga GAPDH. C) Inmunofluorescencia de FGFR4 por microscopia confocal de las células transfectadas estables de SW480 y SW48. DAPI se utilizó para la detección del núcleo de las células (azul). Las fotos representativas muestran a FGFR4 en verde y la actina F en rojo.

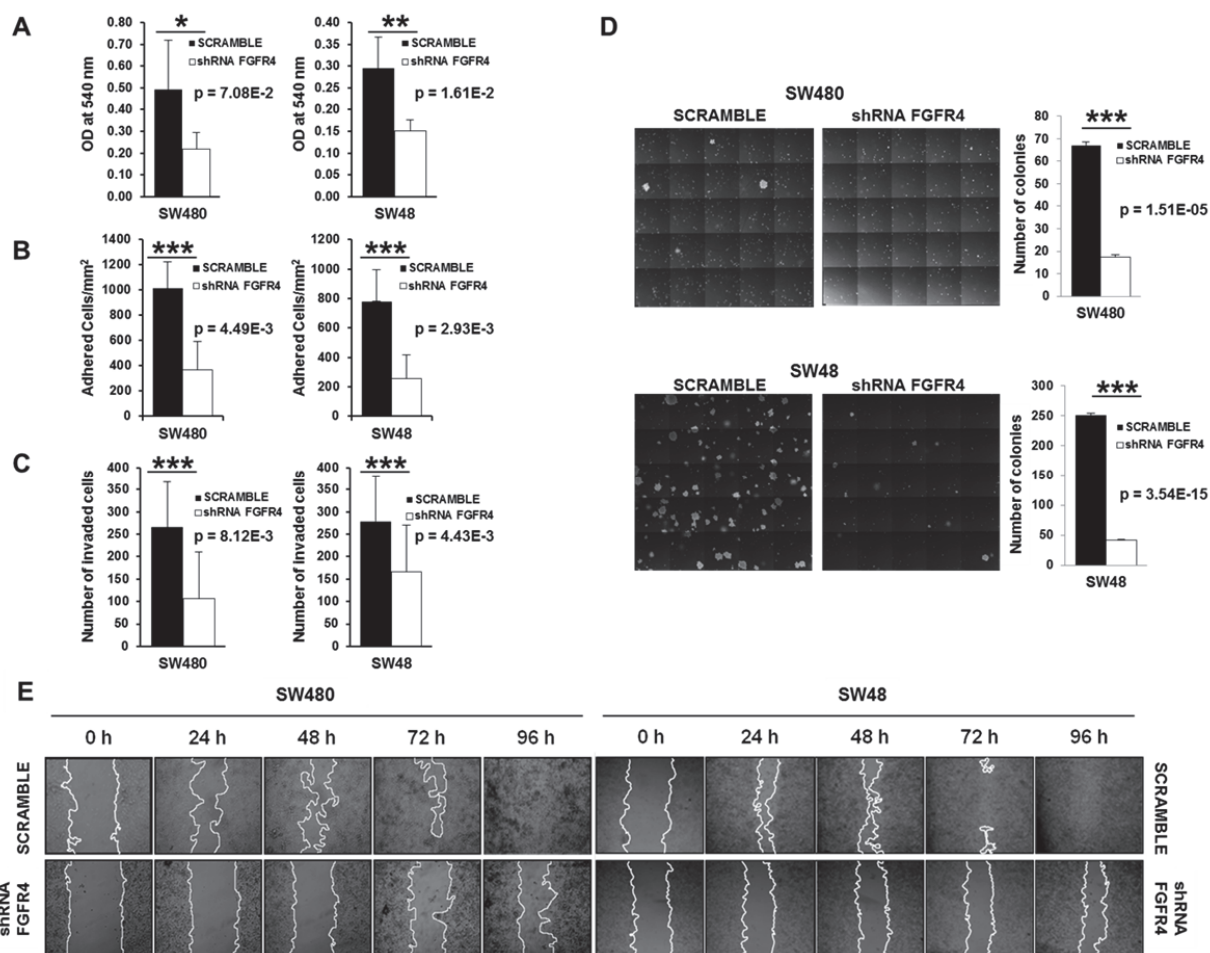
Finalmente mediante inmunofluorescencia de células transfectadas con el shRNA #41, se confirmó una reducción significativa de FGFR4, mostrando solo una tinción residual de FGFR4 localizada en el núcleo de las células SW48 (Figura 20C).

#### 23.1.4.2. Papel de FGFR4 en la tumorigenicidad de las líneas celulares de CCR

Tras confirmar el silenciamiento estable de FGFR4 se analizó su efecto en la capacidad tumorigénica de dichas células; esto es en proliferación, adhesión, invasión, migración y



capacidad de formar colonias. Mediante ensayos de MTT, se observó que células SW480 o SW48 silenciadas mostraban una proliferación menor que las células control ( $p$ -valor  $< 0.01$  y  $< 0.001$ , respectivamente) (Figura 21A). Para la adhesión se utilizaron placas recubiertas de matrigel. La adhesión de las células silenciadas fue aproximadamente 2.5 veces menor en SW480 y 4 veces menor en SW48, que sobreexpresaban FGFR4 (Figura 21B).



**Figura 21. El silenciamiento de FGFR4 produce una disminución de las propiedades tumorigénicas en las líneas de CCR.** A) La proliferación se monitorizó mediante un ensayo de MTT donde se cultivaron las células silenciadas durante 72h. La densidad óptica fue significativamente más baja en las células con FGFR4 silenciado (\*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ). B) La adhesión a Matrigel de las células con FGFR4 silenciado y control se determinó después de mantener a las células en medio sin suero durante 5 h. Se observó una disminución significativa de la adhesión celular por la pérdida de FGFR4. C) Las células control de SW480 y SW48 (scramble) mostraron dos veces más invasividad que las silenciadas. Los datos de todos los experimentos representan la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestran los  $p$ -valores de todos los experimentos. D) La clonogenicidad de las células silenciadas y control se investigó mediante su cultivo en agar blando. Las imágenes microscópicas muestran las colonias que se han formado a los 21 días de cultivo en agar blando. A la derecha de las imágenes se muestran las barras que indican la media del número de colonias contadas con su desviación estándar en tres campos aleatorios de tres experimentos diferentes. E) Mediante ensayos de cierre de herida, se observó durante 96 h cómo las células silenciadas no fueron capaces de cerrar la herida.

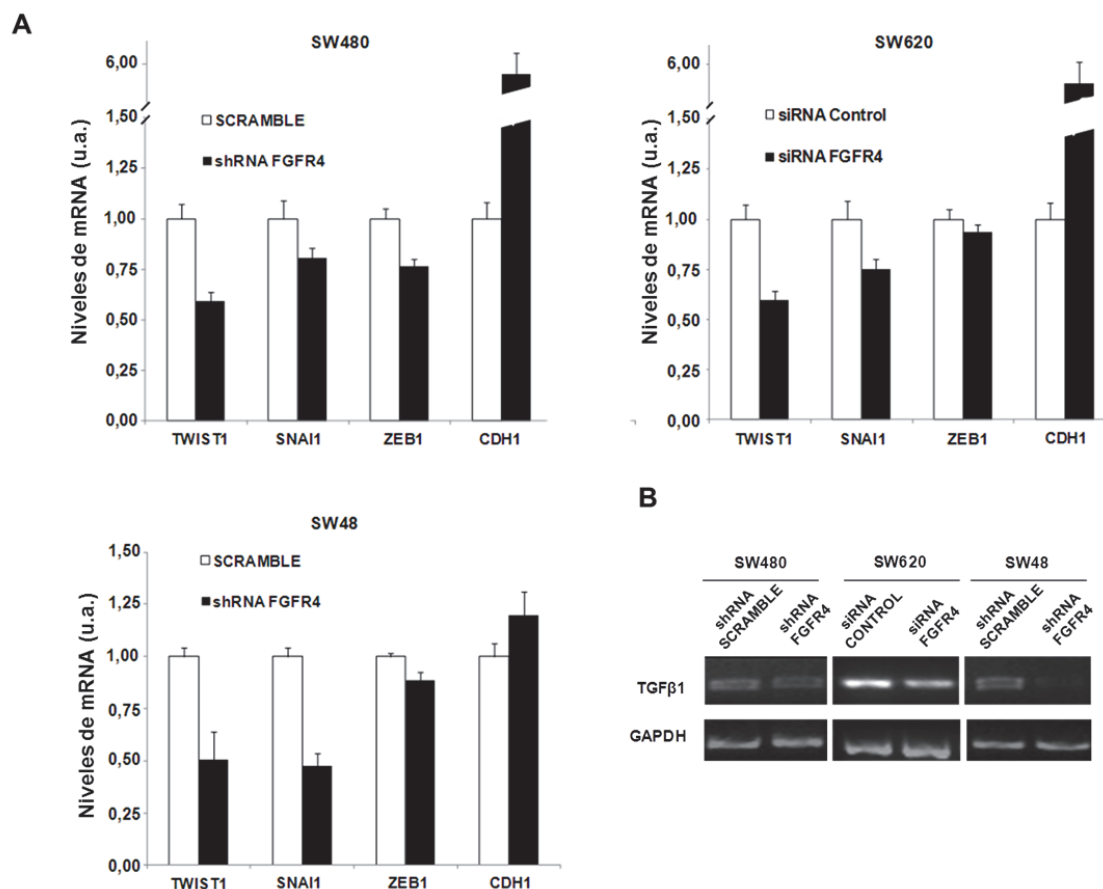
Para el estudio de la invasión se utilizaron cámaras transwell con matrigel. La capacidad de invasión en ambas líneas celulares se redujo 2 veces tras el silenciamiento de FGFR4, en comparación con las células control (Figura 21C). Usando ensayos de cierre de herida, las líneas celulares silenciadas fueron incapaces de cerrar la herida después de 96 h (Figura 21E). El retraso en la migración fue mayor en las células más metastásicas. También se testó la capacidad de las células para crecer en condiciones independientes de anclaje mediante cultivo en agar blando. Se observó que las colonias obtenidas a partir de células control eran significativamente mayores en número y tamaño que en células silenciadas. El ratio entre células control y silenciadas fue similar en ambos casos, pero el número y tamaño de las colonias fue significativamente mayor en las células SW48 (Figura 21D). En conjunto, estos datos indican un papel clave de FGFR4 en la migración e invasión en cáncer colorrectal, siendo más relevantes los resultados obtenidos en células metastásicas, que expresan una mayor cantidad de FGFR4.

#### **23.1.4.3. FGFR4 como efector de la transición epitelio-mesénquima**

Las alteraciones observadas tras el silenciamiento de FGFR4 sugerían que podía existir un efecto sobre la transición epitelio-mesénquima (EMT). Así, se decidió evaluar si el silenciamiento de FGFR4 alteraba los mediadores de la EMT. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de Snail1 (SNAI1), TWIST1, ZEB1 y E-cadherina (CDH1) mediante qPCR (Figura 22A) y TGF $\beta$ 1 mediante PCR semicuantitativa (Figura 22B).

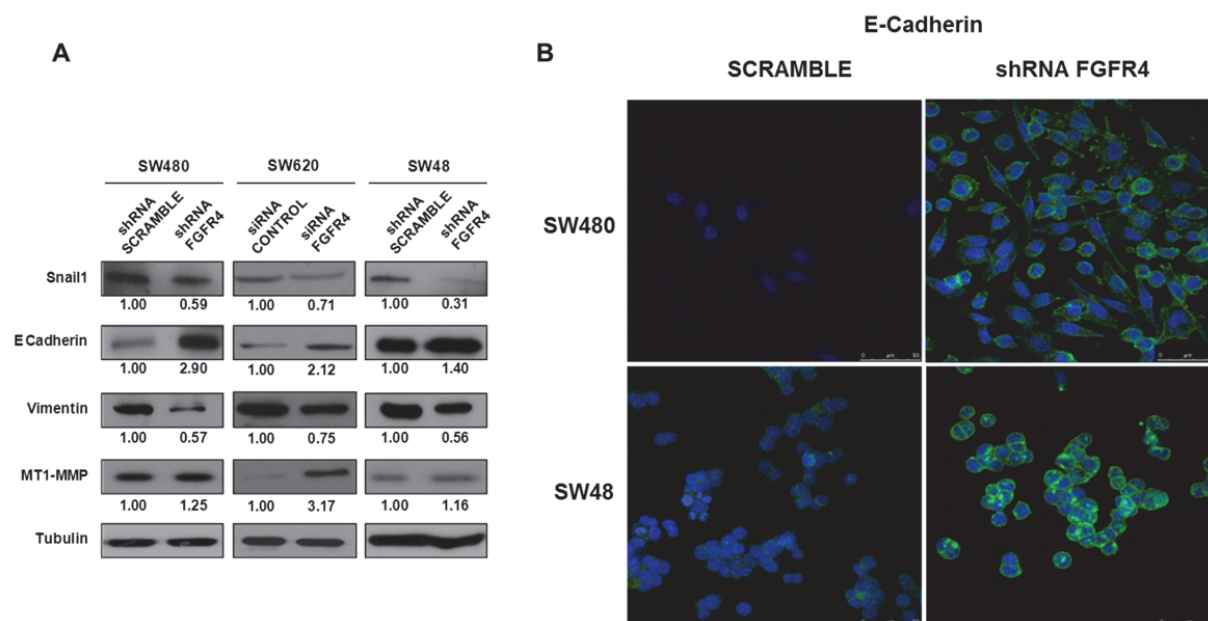
En el par isogénico SW480/SW620, el silenciamiento de FGFR4 provocó una disminución significativa de Snail, TWIST1 y ZEB1, y un aumento significativo de E-cadherina. Sin embargo, en las células SW48, observamos una reducción importante de Snail1 (SNAI1), TWIST1 y TGF $\beta$ , pero sin aumento de E-cadherina. La disminución de ZEB1 fue más significativa en SW480 que en las líneas metastásicas SW620 y SW48. Los niveles de E-cadherina y Snail1 fueron similares a los observados por qPCR. La expresión de vimentina, como marcador mesenquimal, disminuyó por efecto del silenciamiento de FGFR4 en las tres líneas analizadas (Figura 23A). La metaloproteasa de matriz MT1-MMP no sufrió cambios importantes en las células SW48 y SW480, mientras que sufrió un aumento significativo en SW620 similar al aumento de E-cadherina.





**Figura 22. Efecto del silenciamiento de FGFR4 en la expresión de inductores de EMT.** A) El cDNA obtenido a partir del RNA total de las células silenciadas y control fue utilizado para realizar una qPCR usando primers específicos para los genes de Snail1 (SNAI1), TWIST1, ZEB1 y E-Cadherina (CDH1). Se utilizó GAPDH para la normalización de los resultados. Los datos representan la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes. B) RT-PCR semicuantitativa para amplificar TGFβ con el mismo cDNA. Se utilizó GAPDH como control de carga.

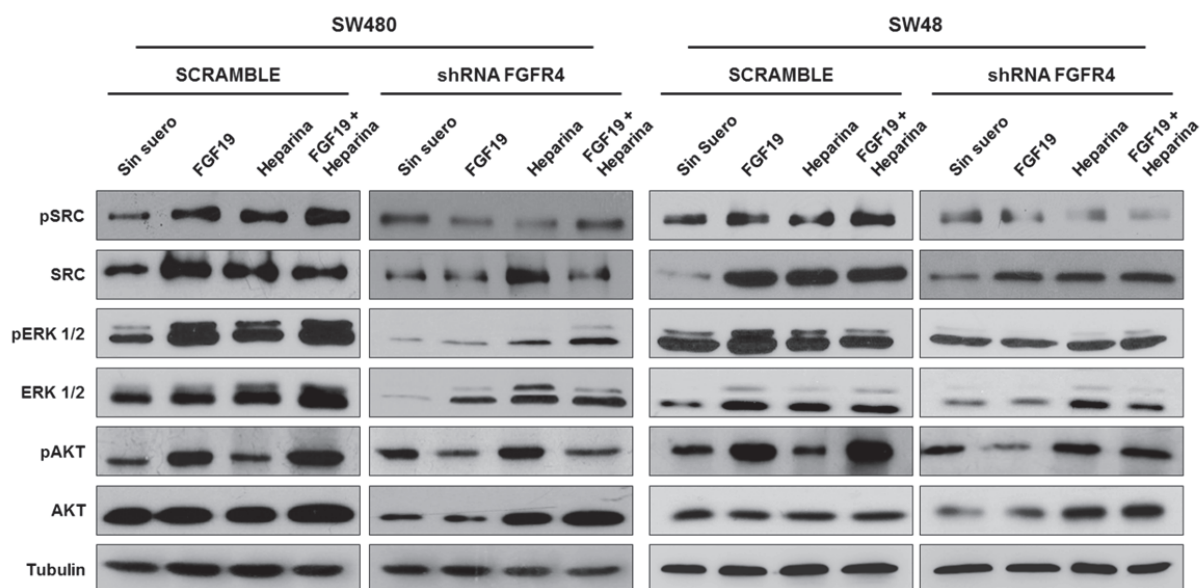
Por inmunofluorescencia confirmamos el incremento de la expresión de E-cadherina, en las uniones adherentes y en los contactos célula-célula tras el silenciamiento de FGFR4 (Figura 23B). Las diferencias en la expresión de E-cadherina fueron más evidentes en la membrana celular, indicando que la expresión de FGFR4 inhibe la expresión de E-cadherina en la superficie celular. En conclusión, el silenciamiento de FGFR4, provocó una reducción de Snail1 y un incremento de E-Cadherina. Todos estos datos nos indican que la pérdida de FGFR4 provoca una reducción del fenotipo mesenquimal y una reversión hacia un fenotipo epitelial, por lo que la capacidad tumorigénica del tumor y especialmente su capacidad metastásica se vería reducida. Por tanto, nuestros resultados sugieren que FGFR4 es un importante efector en la EMT y la invasión celular.



**Figura 23. Efectos del silenciamiento de FGFR4 sobre marcadores epiteliales y mesenquimales.** A) Células silenciadas para FGFR4 y control se lisaron y el extracto proteico se utilizó para WB. La abundancia de cada proteína se cuantificó por densitometría. La tubulina se usó como control de carga. B) Las células silenciadas estables SW480 y SW48 se analizaron mediante inmunofluorescencia. E-Cadherina (verde) y DAPI (azul) para la tinción del núcleo de las células.

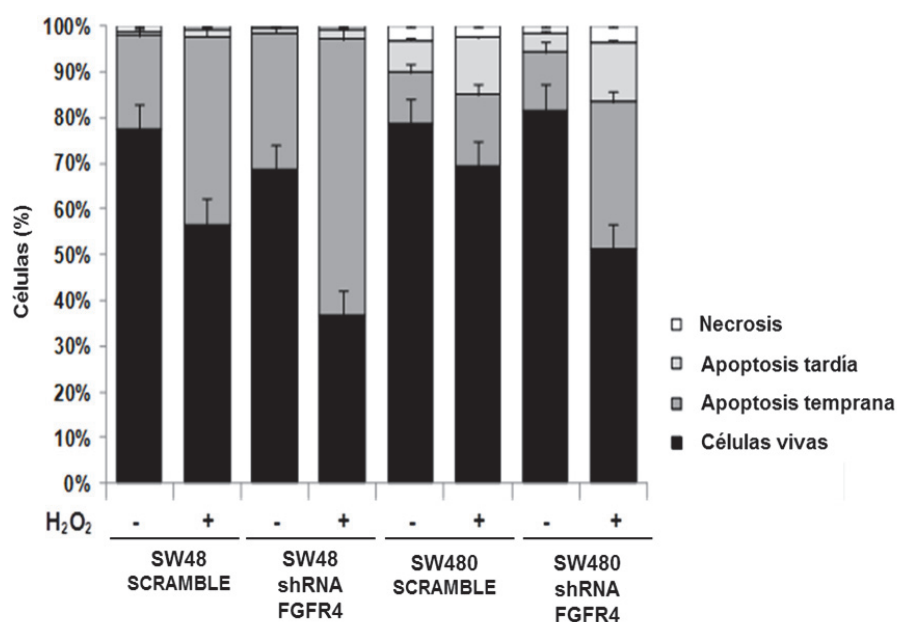
#### 23.1.4.4. Efecto de FGFR4 en señalización y supervivencia celular

Para determinar los efectos de FGFR4 en señalización celular, analizamos las líneas celulares silenciadas para FGFR4 tras la activación con FGF19 y heparina. La fosforilación en SRC, ERK1/2 y AKT fue significativamente menor en las células silenciadas en FGFR4 (Figura 24), destacando la pérdida de la fosforilación en ERK1. Estos datos sugieren que los efectos observados en la EMT pueden deberse a la pérdida de señalización por AKT. Además, se observó que la heparina interacciona con FGFR4 para activar vías de SRC y ERK1/2, pero la vía de AKT es capaz de activarse por su interacción con otro tipo de receptores. Dado que AKT juega un papel muy importante en los procesos de supervivencia celular, se evaluó la respuesta a apoptosis por peróxido de hidrogeno en las células silenciadas (Figura 25). Las células silenciadas muestran un aumento significativo de apoptosis, en torno al 20% respecto de los controles después del tratamiento con peróxido de hidrogeno. Las células silenciadas y control sin tratamiento muestran niveles similares de apoptosis.



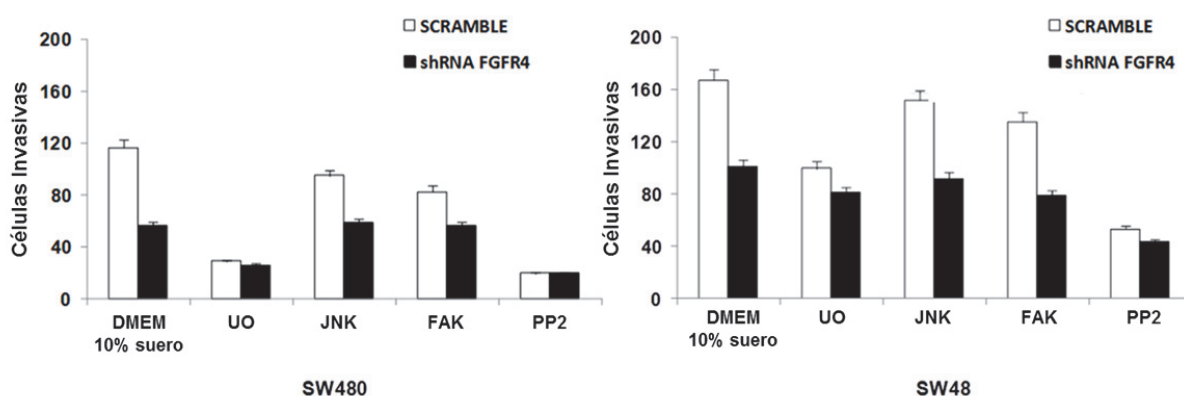
**Figura 24. Vías de señalización alteradas por la expresión y señalización a través de FGFR4.** Las células control y silenciadas de FGFR4 SW480 y SW48 se mantuvieron en medio sin suero y, posteriormente, se incubaron en medio DMEM sin suero con FGF19, heparina o FGF19 más heparina durante 30 min. Las células se lisaron y el análisis se realizó por WB, usando anticuerpos específicos frente a AKT, ERK1/2 y SRC total y forforilado.  $\alpha$ -Tubulina se utilizó como control de carga.

Este efecto de FGFR4 sobre la apoptosis celular en respuesta al estrés oxidativo puede jugar un papel importante en estadios avanzados del cáncer colorrectal, facilitando la supervivencia de las células de CCR.



**Figura 25. FGFR4 participa en la supervivencia celular.** Las células se incubaron en medio DMEM completo con 10% FBS, antibiótico y en presencia o ausencia de  $H_2O_2$  durante 16 h. El experimento de apoptosis se llevó a cabo por citometría. Las células que tienen silenciado FGFR4 presentan un mayor nivel de apoptosis. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestra la mediana  $\pm$  DE de tres experimentos.

Tras el análisis por WB de las vías de señalización activadas por FGFR4 se determinó cuál de ellas participaban directamente en la invasión celular. Para ello, se llevó a cabo un estudio con las células silenciadas y control, utilizando inhibidores específicos. Para este ensayo, utilizamos UO126 (inhibidor de MEK1/2), PP2 (inhibidor de SRC), JNK inhibitor II, y FAK inhibitor 14 (Figura 26).



**Figura 26. FGFR4 señala a través de SRC y ERK.** Para verificar la señalización por FGFR4, las células se trataron con inhibidores de las vías estudiadas por WB. Se incubaron las células control y silenciadas con inhibidores de MEK1/2 (UO126), JNK, FAK y SRC (PP2). Tras el tratamiento se realizaron ensayos de invasión. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

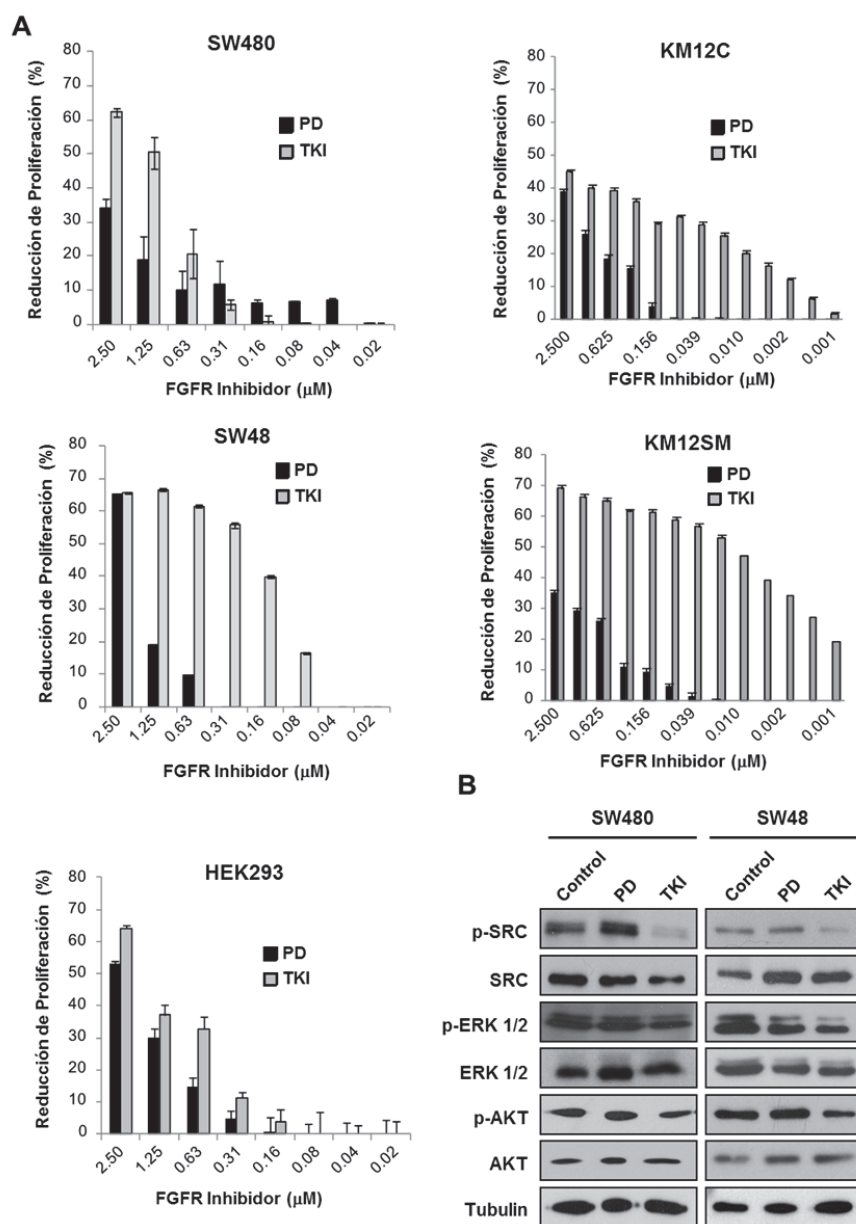
UO126 y PP2 causaron una reducción en la invasión de las células SW480 y SW48, mucho más pronunciada en las células control que en las silenciadas. El inhibidor de JNK causó una menor disminución en las células control respecto a las silenciadas. Estos resultados indican que el silenciamiento de FGFR4 produce una inhibición en la señalización por SRC y ERK1/2, lo que conlleva a una menor invasión de las células SW480 y SW48. Inhibición similar a la obtenida en las células control con inhibidores específicos para ambas vías.

### 23.1.5. FGFR4 como diana terapéutica en cáncer colorrectal

Para valorar el uso de FGFR4 como potencial diana terapéutica se siguieron dos estrategias diferentes. Por un lado, se estudió el efecto de inhibidores de quinasas y, por otro lado, se estudió el uso de anticuerpos específicos de FGFR4 sobre la proliferación celular en líneas de CCR.

23.1.5.1. Inhibición de la proliferación celular por inhibidores de quinasas

Se valoró el efecto de dos inhibidores de quinasas PD173074 y TKI-258 (Dovitinib). El inhibidor PD173074 es un potente inhibidor específico de los receptores tirosín quinasa FGF/VEGF. En cambio, el Dovitinib es un inhibidor muy efectivo de una gran variedad de receptores tirosín quinasa como los receptores FGFR, VEGFR y PDGFR, entre otros. Tras realizar el tratamiento con ambos inhibidores observamos que las células metastásicas, al presentar altos niveles de FGFR4, eran más sensibles a los inhibidores que las poco metastásicas (Figura 27A).



**Figura 27. Efecto de inhibidores de tirosín quinasa sobre la proliferación de líneas de cáncer colorrectal.** A) Se realizaron ensayos de proliferación *in vitro* usando PD173074 y Dovitinib. Los experimentos se llevaron a cabo con DMEM con 10% FBS y antibióticos. Después de 72 h de incubación con las concentraciones indicadas, la viabilidad celular se determinó mediante MTT. Las absorbancias de las células control sin tratar se tomaron como el 100 % de crecimiento celular, y la reducción de la proliferación se calculó con la siguiente fórmula:  $(\text{crecimiento relativo células sin tratar} - \text{crecimiento relativo células tratadas}) / \text{crecimiento relativo de células sin tratar} \times 100$ . Cada columna muestra la media de tres experimentos independientes, testando cada concentración por triplicado. Las barras indican la desviación estándar de cada ensayo. B) Para validar cómo afectan los inhibidores a la señalización de FGFR4, realizamos un análisis por WB de las células SW480 y SW48 tras su tratamiento durante 5 h con 1.25  $\mu\text{M}$  de inhibidor. Las células se lisaron y se llevó a cabo el WB usando anticuerpos específicos para AKT, ERK1/2 y SRC total y fosforilado. La tubulina se utilizó como control de carga.

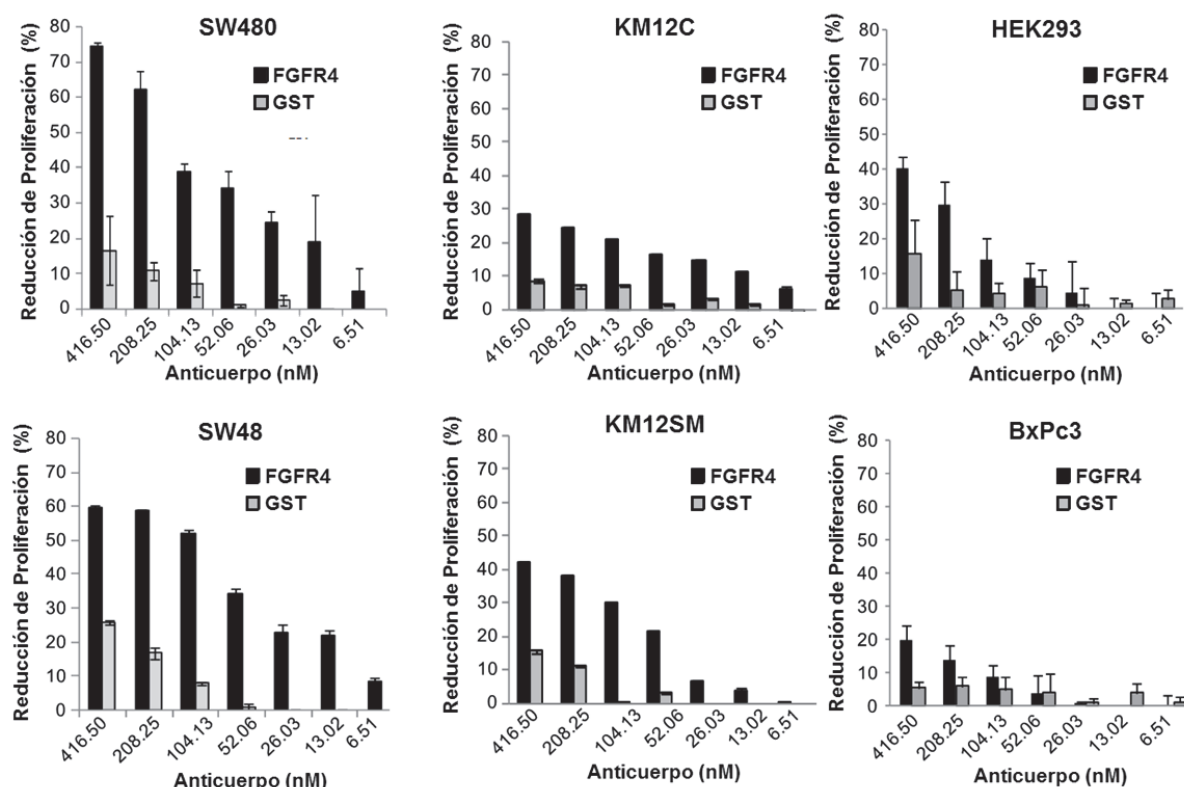
El Dovitinib fue mucho más efectivo en la inhibición de la proliferación que el inhibidor pan-FGFR PD173074, de manera dosis dependiente ( $p$ -valor  $<0.001$ ) y, principalmente, en células metastásicas. A 80 nM, la inhibición producida en las células metastásicas (20% en las SW48 y 60% en las KM12SM) fue significativamente mayor que en las células control y en las no metastásicas. El Dovitinib, fue capaz de inhibir la proliferación de las células KM12 hasta rangos muy bajos de concentración (1 nM). Las HEK293 o control, con una baja expresión de FGFR4, presentaban una menor inhibición (Figura 27A). Por WB se observó en las líneas SW480 y SW48 una reducción importante (alrededor del 90%) en la activación de SRC, una reducción significativa (en torno al 60%) en la activación de ERK1/2 y una pequeña reducción de los niveles de fosfo-AKT (Figura 27B). En conjunto, las vías de señalización alteradas por el uso de los inhibidores coinciden con lo observado en el silenciamiento, confirmando la implicación de FGFR4 en las vías de señalización de SRC y MAP quinasas.

#### **23.1.5.2. Inhibición de la proliferación celular mediante anticuerpos específicos para FGFR4**

A continuación, se valoró el efecto del tratamiento con anticuerpos específicos de FGFR4 sobre la proliferación de líneas celulares (Figura 28). La mayor inhibición se obtuvo a una concentración de anticuerpo de 400 nM, aunque se observaron reducciones significativas de la proliferación a concentraciones entre 13 y 26 nM dependiendo de la línea celular. El efecto fue más importante sobre SW480 y SW48 que KM12C o KM12SM y fue mayor en las células KM12SM que en las células KM12C, alcanzando un 42% de la inhibición de la proliferación después del tratamiento con el anticuerpo. Los mayores efectos se observaron en SW480 y SW48, donde se alcanzó un 70% y un 55% de inhibición, respectivamente. Los efectos producidos sobre la línea BxPc3 de cáncer de páncreas no fueron significativos, tanto con el anticuerpo para FGFR4 como con el control, siendo de un 18% a una concentración de 400 nM y no observándose reducción de la proliferación a 100 nM. Los efectos del tratamiento sobre HEK293 fueron menos significativos que los que se obtuvieron con las líneas de CCR.

En conjunto estos datos indican la capacidad de inhibición significativa de la proliferación celular en CCR con el uso de anticuerpos o inhibidores químicos frente a FGFR4 de manera proporcional a sus niveles de expresión, tanto en células metastásicas como no metastásicas, confirmando el potencial de FGFR4 como diana terapéutica en CCR.

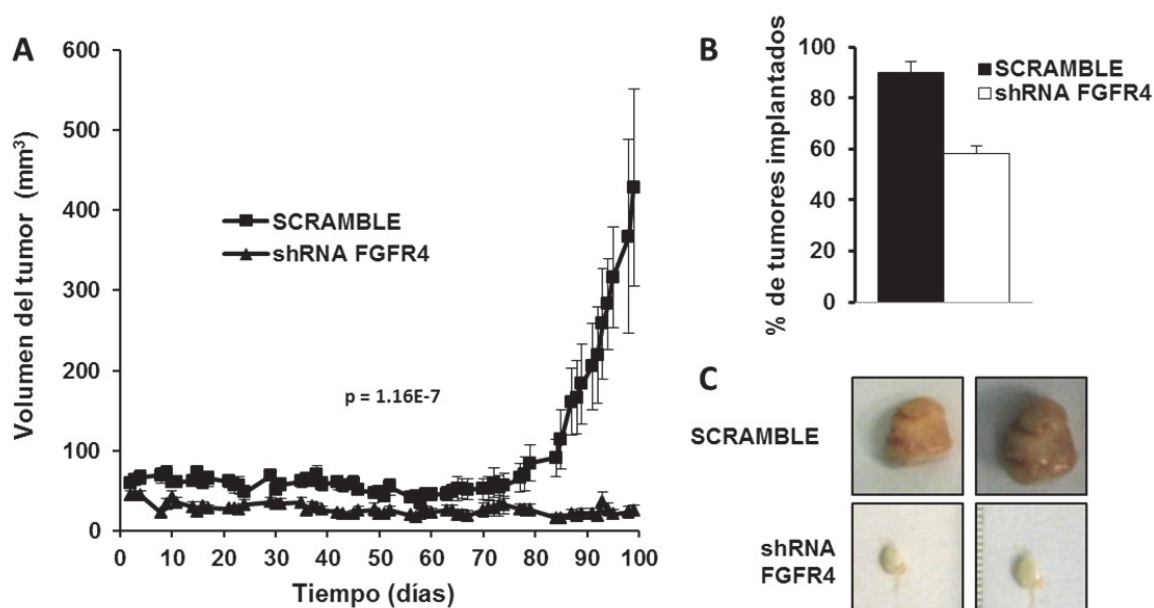




**Figura 28. Anticuerpos anti-FGFR4 inhiben la proliferación de las células de CCR *in vitro*.** Células KM12C, SW480, KM12SM, SW48 y células control BxPc3 y HEK293 se incubaron con anticuerpos específicos frente a FGFR4 en DMEM completo con 10% FBS. Tras 72 h de incubación se llevaron a cabo ensayos de MTT (570 nm) para determinar el crecimiento celular. Los datos se obtuvieron igual que el experimento de la figura 27.

### 23.1.5.3. Efectos *in vivo* del silenciamiento de FGFR4

Como validación final del efecto del silenciamiento de FGFR4, se realizaron ensayos *in vivo* en ratones desnudos. Se inyectaron  $1 \times 10^7$  células SW480, SW48 silenciadas y control subcutáneamente en ratones Swiss nude para analizar el efecto del silenciamiento de FGFR4 en el crecimiento tumoral *in vivo* (Figura 29A). Se observó que las células SW48 control formaron tumores en más del 90% de los ratones inyectados, mientras que las células con FGFR4 silenciado sólo formaron tumores en menos del 60% de los animales (Figura 29B). Las células SW480 fueron incapaces de formar tumores de un tamaño cuantificable, por lo que no se consideraron para este estudio. Un dato destacable es la existencia de una inhibición total de la vasculatura del tumor en los tumores extirpados correspondientes a las células silenciadas (Figura 29C). En glioma, se ha descrito que la supresión de la expresión de FGFR1 y FGFR2 es capaz de alterar procesos de neogénesis en este tipo de cancer (213), pero no existen datos al respecto sobre FGFR4 y su papel en la angiogénesis en ningún tipo tumoral.



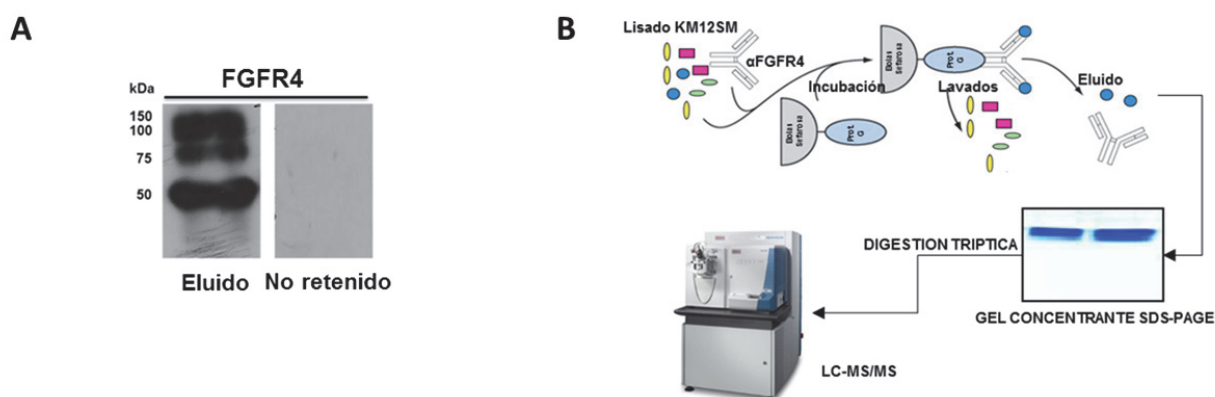
**Figura 29. El silenciamiento de FGFR4 limita el crecimiento y la vascularización del tumor *in vivo*.** A) Las células control y silenciadas frente a FGFR4 de SW48 se inyectaron subcutáneamente en ratones desnudos (Swiss) monitorizando el crecimiento del tumor cada 3 días para cada población celular. La comparación final de los tumores originados entre ambas cohortes fue estadísticamente significativa. B) Porcentaje de tumores implantados para cada condición. C) A día 100, ambos grupos de animales se sacrificaron, necropsiaron y los tumores se diseccionaron y fotografiaron.

En definitiva, como recogemos en el trabajo publicado (214), FGFR4 controla la invasión tumoral, la proliferación y procesos de vascularización del tumor. Por tanto, FGFR4 aparece como un claro candidato para su desarrollo como diana terapéutica en CCR.

### 23.1.6. Identificación de mediadores de la señalización de FGFR4 mediante espectrometría de masas

Para identificar nuevos mediadores de la señalización de FGFR4, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de FGFR4 en un lisado proteico de KM12SM, que expresa altos niveles de FGFR4, con un anticuerpo policlonal acoplado de sefarosa. Como control, se trató en paralelo un lisado de KM12SM con una IgG no relacionada y así descartar la unión de proteínas inespecíficas. Por WB se verificó el enriquecimiento significativo de la proteína FGFR4 (Figura 30A). Mediante una electroforesis monodimensional en SDS-PAGE convencional, se concentró todo el extracto en 2 bandas que se digirieron con tripsina en gel y se procedió a la identificación de los péptidos tripticos mediante análisis por LC-MS/MS (Figura 30B).





**Figura 30. Inmunoprecipitación de FGFR4 y caracterización mediante LC-MS/MS para detectar proteínas que interaccionen con FGFR4.** A) Comprobación por WB de la inmunoprecipitación de FGFR4 con el anticuerpo policlonal. B) Protocolo de inmunoprecipitación e identificación mediante espectrometría de masas.

Se identificaron 1536 péptidos que corresponden a 683 proteínas. Estas proteínas se filtraron con los resultados de la IgG control y la base de datos “Crapome”, una base de datos que recoge los contaminantes más comunes que aparecen en experimentos de afinidad por espectrometría de masas. De esta manera se redujo la lista a un total de 140 proteínas (Tabla Suplementaria 1). Tras revisión bibliográfica sobre sus posibles implicaciones en apoptosis, crecimiento celular o angiogénesis, se seleccionaron 15 proteínas (Tabla 12), que pueden interactuar directa o indirectamente con el receptor FGFR4. Se observó una gran cantidad de proteínas relacionadas con señalización a través de Ras (RALA, RHOC, RHOG, RAC3 y TOLLIP), que participan en el control de la migración y la adhesión celular. También destacan algunas proteínas como MCTS1, BAP31 o S100A14. MCTS1 es un oncogén implicado en la regulación del ciclo celular, mecanismos de reparación del DNA y especialmente en la angiogénesis. BAP31 y S100A14 participan directamente en el control de la apoptosis por vías de señalización que implican la participación de caspasas y p53 respectivamente.

Estas proteínas específicas de la inmunoprecipitación de FGFR4 pueden ser claves para determinar el papel de FGFR4 en procesos de supervivencia celular o vascularización tumoral donde los procesos de EMT no juegan ningún papel. Estas proteínas y su interacción con FGFR4 abren vías de estudio novedosas para comprender el papel de FGFR4 en CCR y el posible desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

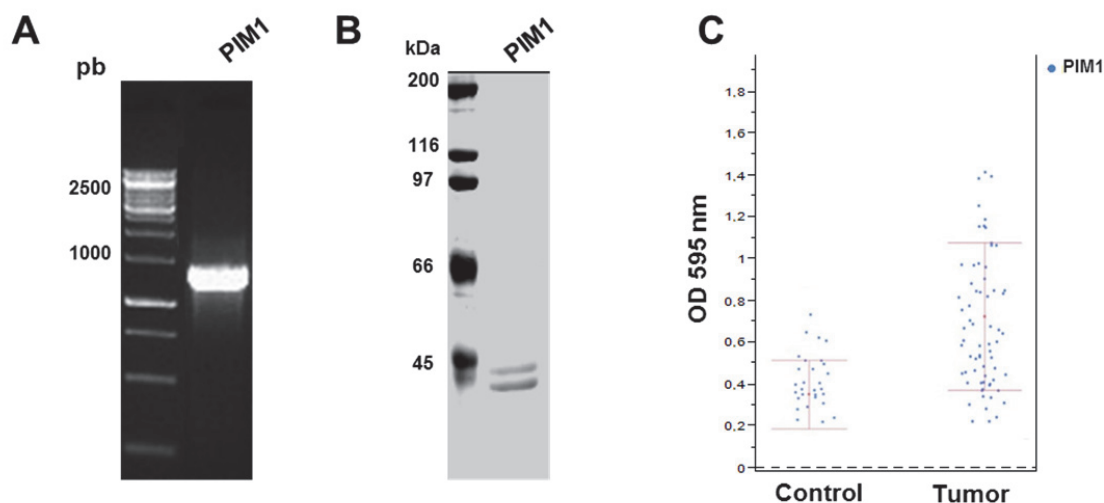
**Tabla 12. Proteínas identificadas implicadas en distintos procesos celulares como apoptosis o proliferación celular**

Número de Acceso	Descripción	Gen	Cobertura (%)	Peptidos identificados	Función
P51572	B-cell receptor-associated protein 31	BAP31	18.70	5	Chaperona que participa en transporte y regula la actividad de la Caspasa 8
Q9BUP3	Oxidoreductase HTATIP2	HTAI2	3.31	1	Oxidoreductasa necesaria para la supresión tumoral
Q9ULC4	Malignant T cell-amplified sequence 1	MCTS1	16.02	2	Gen supresor de tumores que controla el ciclo celular
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	PGRMC1	18.97	3	Se asocia con EGFR para controlar la activación de MMP9
P53801	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	PTTG	10.00	1	Translocación de PTTG al núcleo
P60763	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	RAC3	9.90	2	GTPasa que participa en procesos de adhesión celular
P11233	Ras-related protein Ral-A	RALA	12.14	2	GTPasa que participa en distintas funciones celulares
P08134	Rho-related GTP-binding protein RhoC	RHOC	5.70	1	Señalización celular entre receptores de membrana y citoesqueleto
P84095	Rho-related GTP-binding protein RhoG	RHOG	8.90	1	Participa en procesos de migración celular
Q15404	Ras suppressor protein 1	RSU1	17.69	4	Posible señalizador de la vía de transducción RAS
Q9HCY8	Protein S100-A14	S100A14	25.00	2	Regula los niveles de p53
O75663	TIP41-like protein	TIPRL	3.31	1	Regulador de la fosfatasa PP2A
Q9H0E2	Toll-interacting protein	TOLIP	5.11	1	Componente de la vía de señalización de IL-1 y receptores Toll-like
Q15631	Translin	TSN	10.53	3	Activador del complejo RISC
Q99598	Translin-associated protein X	TSNAX	8.97	2	Activador del complejo RISC

## 23.2. PIM1

### 23.2.1. Respuesta humoral frente a PIM1 en el suero de pacientes con CCR

Siguiendo el mismo abordaje que el usado con FGFR4, procedimos a estudiar la respuesta humoral en la serie de pacientes utilizada para el análisis de las alteraciones genéticas. El clon para PIM1 se obtuvo de la colección MGC. Su cDNA se amplificó por PCR para subclonarlo en el vector pET28a (Figura 31A) y expresar PIM1 en células BL21 DE3 de *E. coli* (Figura 31B). Utilizando PIM1 purificada, se analizó su reconocimiento por los sueros procedentes del Hospital Puerta de Hierro y del Hospital de Cabueñes (Figura 31C) mediante ELISA. Los resultados del ELISA mostraron una mayor reactividad frente a PIM1 de los sueros de pacientes con CCR (media PIM1 = 0.715, 95%IC: 0.3-1.5, p-valor <0.003) que los pacientes control (media PIM1 = 0.372, 95%IC: 0.2-0.6, p-valor <0.004).



**Figura 31. Análisis de la respuesta humoral frente a PIM1 en los pacientes seleccionados.** A) El producto de amplificación de PIM1 por PCR se cargó en un gel de agarosa al 2% en TAE en presencia de Gel Red. B) La proteína PIM1 tras su purificación se cargó en un gel de SDS-PAGE al 10% y se tiñó con Azul de Coomassie. C) Valores de ELISA para PIM1 obtenido con sueros de pacientes con CCR y control, procedentes del Hospital Puerta de Hierro (Madrid) y Hospital de Cabueñes (Gijón).

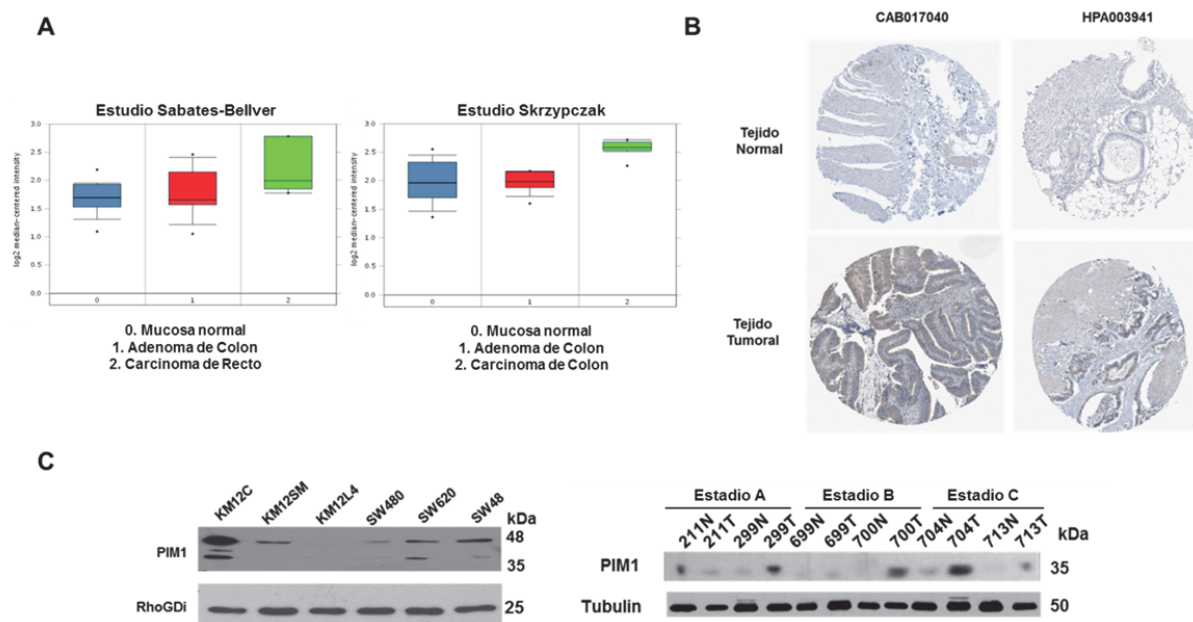
### 23.2.2. PIM1 aparece levemente sobreexpresado en tejidos de CCR

En trabajos previos, nuestro laboratorio analizó la expresión de PIM1 en un TMA de CCR. La expresión de PIM1 fue moderada-alta en 36 de los 42 tejidos tumorales analizados, y no se detectó en 30 de los 35 tejidos normales. PIM1 se detectó principalmente en el citoplasma de las células tumorales lo que confirmó que la expresión de PIM1 es significativamente superior en tejidos tumorales (73).

Aquí, realizamos el meta-análisis de los niveles de expresión de PIM1 en pacientes de CCR utilizando la base de datos Oncomine (198, 199) (Figura 32A). Los niveles de mRNA tanto en el estudio de Sabates-Bellver (206) como en el de Skrzypczak (207) no presentan niveles altos de expresión para PIM1 en adenomas, pero sí en carcinoma colorrectal. Según la base de datos del Human Protein Atlas (200) (Figura 32B), el tejido normal prácticamente no expresa PIM1 según las tinciones realizadas con dos anticuerpos distintos (CAB017040 y HPA003941). Con el anticuerpo HPA003941 no se ve tinción en ninguna célula tumoral. En cambio, para el anticuerpo CAB017040 se observó una tinción moderada en el citoplasma de las células tumorales en 5 de 11 casos analizados. Esta discrepancia entre ambos anticuerpos puede ser debido a la calidad de los anticuerpos utilizados y que no son adecuados para esta técnica.

## Resultados

En cambio, el anticuerpo utilizado previamente en nuestro laboratorio para el análisis del TMA se mostró más eficaz (73).

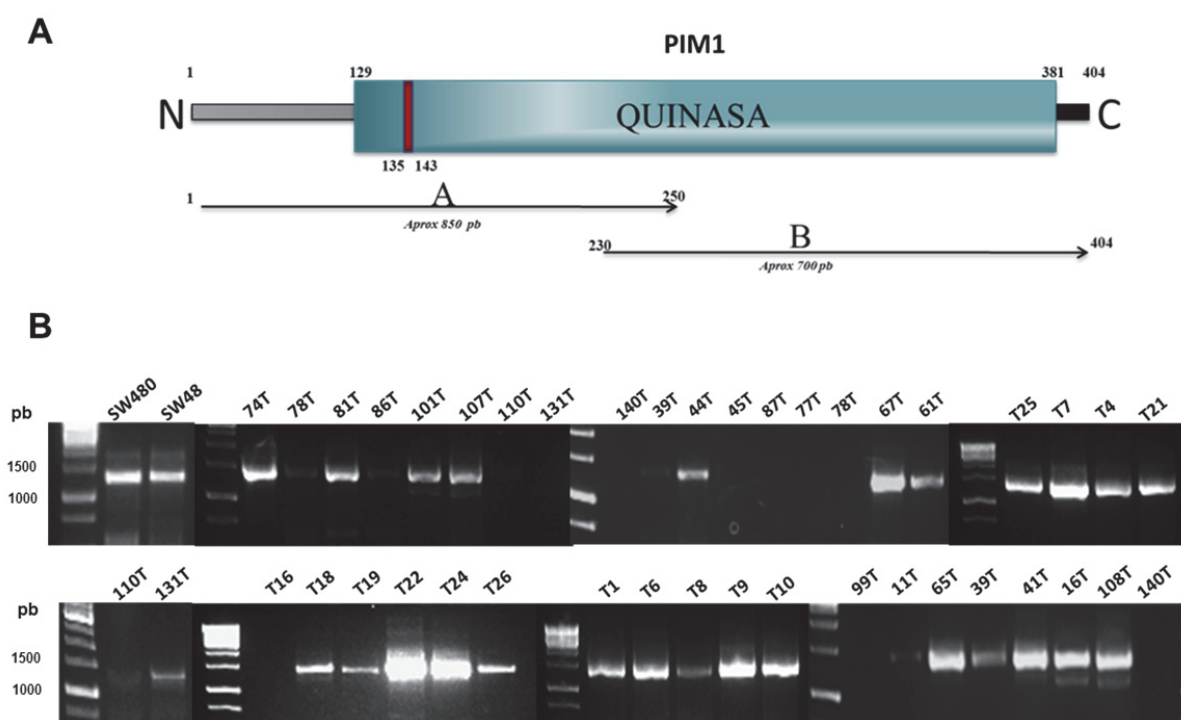


**Figura 32. Análisis de los niveles de expresión de PIM1 en CCR.** A) Los niveles relativos de expresión génica de PIM1 se analizaron mediante dos estudios de la base de datos Oncomine. En ambos estudios se muestra un aumento de la expresión de PIM1. B) Los niveles relativos de PIM1 mediante IHC se analizaron en el Human Protein Atlas, en donde aparecen los resultados para dos anticuerpos distintos. Se verificó el aumento de PIM1 en tejido tumoral de CCR con el anticuerpo CAB017040. C) Por WB se analizó la expresión de PIM1 en líneas de CCR y en muestras tumorales pareadas. Se utilizó RhoGDI o tubulina como control de carga.

Finalmente, se analizó mediante WB la expresión de PIM1 en líneas celulares de CCR con distintas capacidades metastásicas y extractos de tejidos pareado normal/tumoral de pacientes con CCR (Figura 32C). Se observó que la expresión de PIM1 en las líneas celulares de CCR es muy variable. En el par isogénico KM12 vemos que las KM12C con menor capacidad metastásica, presentan mayores niveles de PIM1 que las líneas KM12SM y KM12L4 de elevada capacidad metastásica. En cambio, para el par isogénico SW480/SW620, las células más metastásicas presentan mayores niveles de PIM1. Por otro lado, en los extractos de tejido vemos que PIM1 presenta mayor expresión en pacientes que se encuentran en los estadios avanzados de la enfermedad. Estos datos junto a las IHQ realizadas en nuestro laboratorio indican claramente que la sobreexpresión de PIM1 se encuentra mayormente en estadios avanzados de la enfermedad.

### 23.2.3. PIM1 presenta una gran variedad de mutaciones somáticas y alteraciones en CCR

Dado que PIM1 no mostró una clara sobreexpresión en estadios tempranos de CCR, según nuestra hipótesis debería presentar algún otro tipo de alteraciones para explicar la presencia de autoanticuerpos. Así, procedimos a secuenciar el mRNA de PIM1 para verificar la posible presencia de mutaciones. La amplificación del mRNA en la mayoría de las muestras analizadas (tanto de líneas celulares como de tejidos de pacientes) se llevó a cabo en una sola reacción de PCR, y la secuenciación se realizó con dos amplificaciones inferiores a 1000 pb (Figura 33A). Al igual que en el estudio de FGFR4, se realizó la optimización de las reacciones de PCR en las células SW48, SW480, KM12C y KM12SM.



**Figura 33. Análisis genético de PIM1 en líneas celulares y tejidos de cáncer colorrectal.** A) Esquema de los fragmentos que se amplifican por PCR para la secuenciación directa de PIM1. B) PCRs de las líneas celulares y de los tejidos tumorales de los pacientes de CCR. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la amplificación de los fragmentos indicados, o bien, se amplificó por PCR todo el mensajero y se secuenció por fragmentos.

La amplificación se optimizó realizando 35 ciclos de PCR para ambas condiciones, y evaluando los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1.5%. Se utilizó distinta temperatura para la reacción del fragmento completo (60°C) en el paso de anillamiento de los primers que en la reacción de los fragmentos separados (58°C), donde se obtuvieron amplificaciones más limpias (Figura 33B). En la secuencia del cDNA de PIM1 en las líneas

celulares únicamente detectamos la presencia del SNP His48Asp en KM12 (Tabla 13). Este polimorfismo (C299G) sólo afecta a la isoforma de 44 kDa y provoca la sustitución de una histidina por un aspártico, en la posición 48. Se trata de un polimorfismo poco estudiado a pesar de que presenta una prevalencia en torno al 30-50% según reflejan los datos del proyecto de los “1000 genomas” (210). En la población ibérica la prevalencia se encuentra alrededor del 32%. Al encontrarse únicamente en la isoforma de 44 kDa descrita recientemente (86), no hay estudios sobre las posibles implicaciones que pueda tener en la progresión tumoral, o su utilidad en diagnóstico y/o pronóstico de CCR, por lo que su estudio como un posible marcador de pronóstico genético era una vía interesante de estudio.

Una vez optimizada la amplificación de PIM1 por PCR en líneas pasamos a estudiar los pacientes. En la mayoría de ellos pudimos obtener la secuenciación de PIM1 en una única reacción de PCR (Figura 33B), pero en tres de ellos (77T, 99T y 140T) las reacciones de PCR para los fragmentos A y B se realizaron por separado.

**Tabla 13. Mutaciones encontradas en PIM1 en líneas celulares y pacientes de CCR.**

MUTACIÓN	MUTACIÓN MENSAJERO	MUTACIÓN PROTEÍNA	PACIENTES	FRECUENCIA EN PACIENTES	LINEAS CELULARES	PUBLICADA
SNP rs262936	C299G	His48Asp	5T, 11T, 41T, 75T, T7, T8, T10, T23	20%	KM12	Si
DELECCIÓN	G1068-	Δ303	5T	2.5%	-	No
SILENCIOSA	A1335G	-	44T	2.5%	-	No
SOMÁTICA	T354G	Leu66Arg	107T	2.5%	-	No
SILENCIOSA	C1093T	-	74T	2.5%	-	No
SOMÁTICA	G1100A	Ala315Thr	77T, 78T, 108T, 140T	10%	-	No
SOMÁTICA	C1380A	Pro402Leu	67T	2.5%	-	No
SILENCIOSA	C846A	-	T9	2.5%	-	No
SOMÁTICA	G321A	Ser55Asn	T4	2.5%	-	No
SILENCIOSA	C1165T	-	T7	2.5%	-	No
SOMÁTICA	T1073A	Tyr306Asn	T24	2.5%	-	No
SOMÁTICA	T1125A	Leu323Gln	T26	2.5%	-	No

Al analizar las secuencias de los pacientes encontramos un alto número de mutaciones. El polimorfismo descrito en KM12 (His48Asp) se observó en un 20% de los pacientes analizados. Además, se identificaron otras siete mutaciones somáticas diferentes (Tabla 13), destacando por su alta frecuencia la mutación G1100A en el 10% de los pacientes analizados, que origina el cambio Ala315Thr en el dominio quinasa. También se encontraron otras seis

mutaciones somáticas en pacientes individuales de CCR. Entre ellas, destacamos la observada en el paciente 5T, donde se produce una delección del nucleótido G1068 que provoca la transformación del triplete TGG (Trp 304) en un codón stop TGA, produciendo una proteína PIM1 truncada ( $\Delta 303$ ) sin el dominio quinasa.

En conjunto, los datos indican un alto número de mutaciones en PIM1 lo que podría explicar la aparición de autoanticuerpos. De hecho, el 50% de los pacientes que presentan el polimorfismo His48Asp tienen niveles altos de autoanticuerpos frente a PIM1. Los pacientes con mutaciones somáticas presentaron también altos niveles de autoanticuerpos de PIM1, excepto el paciente T4 con mutación Ser55Asn, cuyo suero no mostró señal en el ELISA.

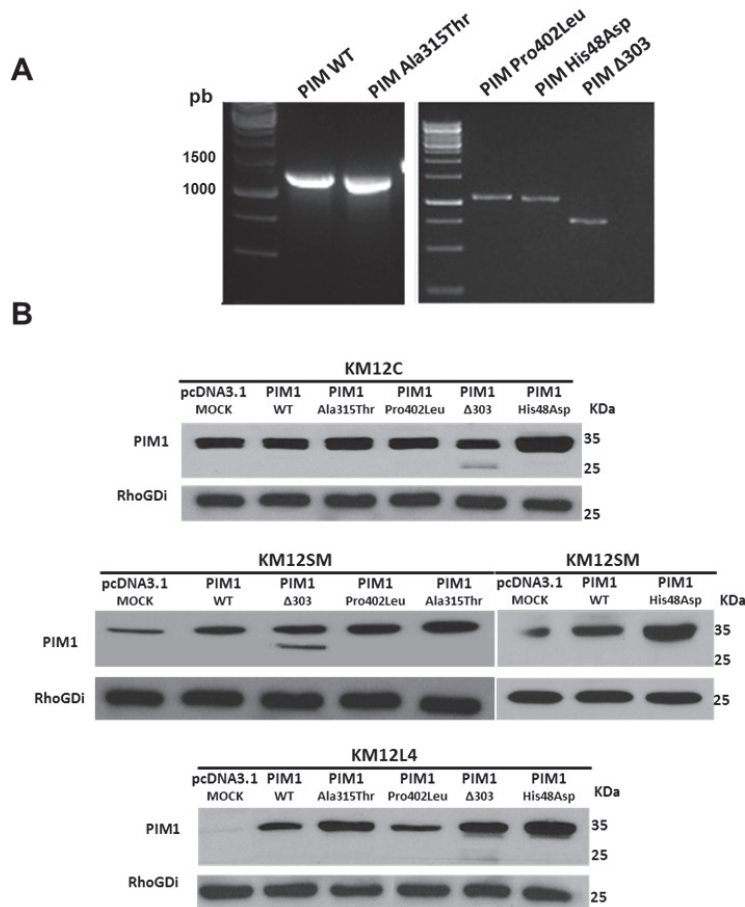
### **23.2.4. Alteraciones genéticas descritas en PIM1 modifican las propiedades tumorigénicas de líneas celulares de CCR**

Al tratarse de mutaciones no descritas previamente, se estudió su implicación en proliferación, invasión, adhesión y supervivencia celular. Así, se procedió a generar los vectores con las secuencias de cuatro mutantes identificadas.

#### **23.2.4.1. Obtención de los mutantes de PIM1 por PCR y clonaje en vector de expresión de mamíferos.**

Se seleccionaron las proteínas con las mutaciones que aparecen en un alto número de pacientes (His48Asp y Ala315Thr), la mutación que producía mayor inmunorreactividad en ELISA (paciente 67T, Pro402Leu) y la que mayor cambio produce en la estructura de la proteína (paciente 5T,  $\Delta 303$ ). Se generaron mediante mutagénesis dirigida por PCR (175, 176). Se obtuvo el fragmento de PIM1 y sus variantes por PCR. Tras su digestión con enzimas de restricción específicas, se subclonaron en el vector de expresión pcDNA3.1 para realizar ensayos funcionales en las líneas celulares (Figura 34A).





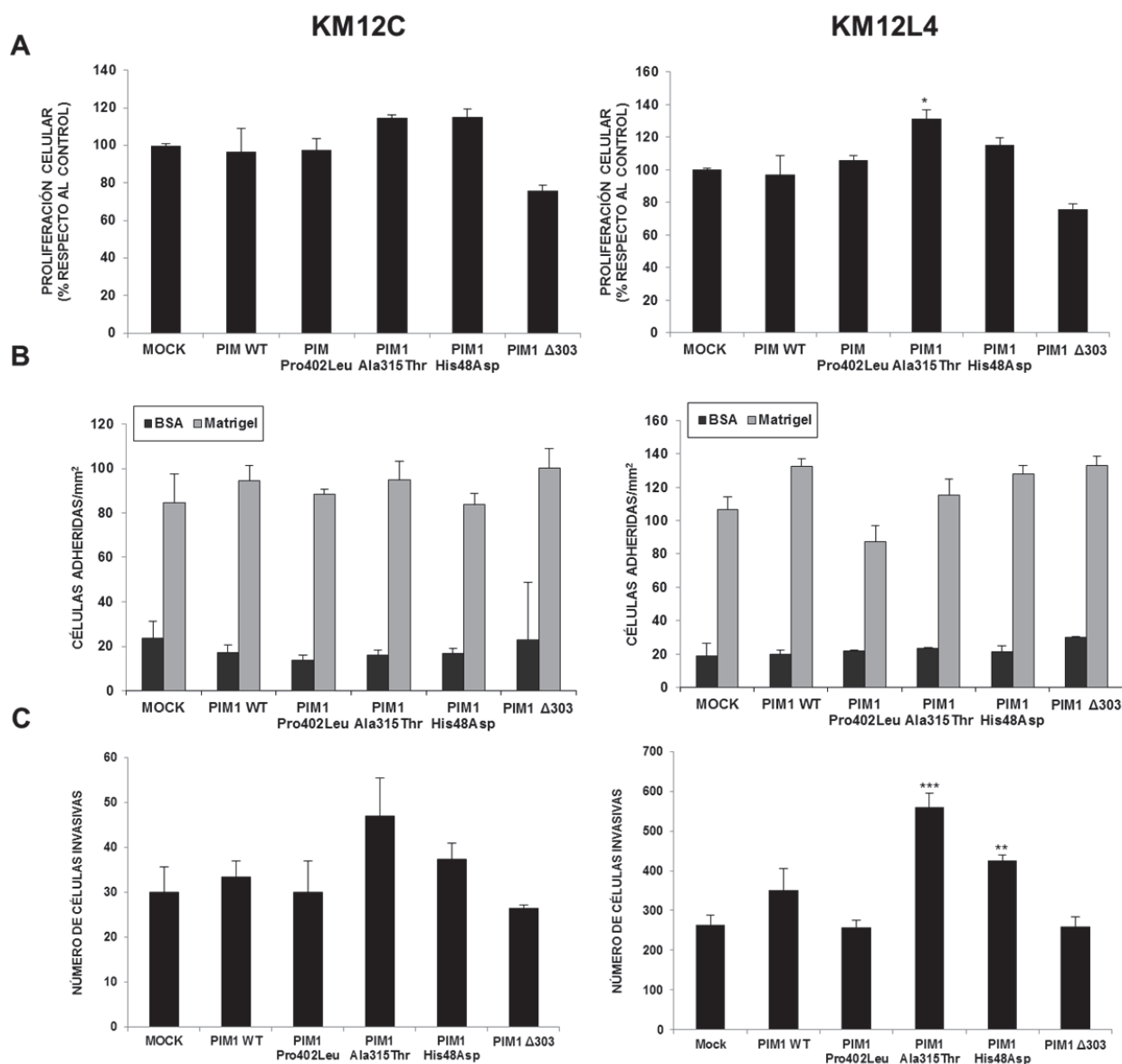
**Figura 34. Obtención y expresión de los mutantes de PIM1 en líneas de CCR.** A) Amplificaciones de los fragmentos correspondientes al gen de PIM1 completo y con las mutaciones indicadas. B) WB tras 24 h de transfección de los vectores pcDNA3.1 con las distintas construcciones de los mutantes de PIM1 en las líneas KM12C, KM12SM y KM12L4.

Cuando se evaluaron los niveles de expresión para PIM1 en las líneas KM12C y KM12L4 se observó que presentaban niveles endógenos de PIM1 muy diferentes (Figura 32C). Los niveles de PIM1 endógenos en las líneas KM12C y KM12SM nos llevó a incluir la línea KM12L4 en los ensayos funcionales para evaluar la sobreexpresión de PIM1 y observar los cambios en las propiedades tumorigénicas. Se realizaron las transfecciones transitorias de los plásmidos pcDNA3.1 con las distintas construcciones en ambas líneas celulares y se confirmaron por WB los niveles de expresión de PIM1 a las 36 h de la transfección (Figura 34B), observándose una buena expresión de todos los mutantes. En las líneas que expresan el mutante  $\Delta$ 303 presentan una doble banda que puede corresponder a nuestro mutante de delección pero no lo hemos podido comprobar.

**23.2.4.2. La mutación puntual Ala315Thr aumenta las capacidades tumorigénicas de las líneas celulares de CCR**



A continuación, se analizaron los efectos sobre las propiedades tumorigénicas de los 4 mutantes mediante distintos ensayos funcionales utilizando la línea KM12C como control.



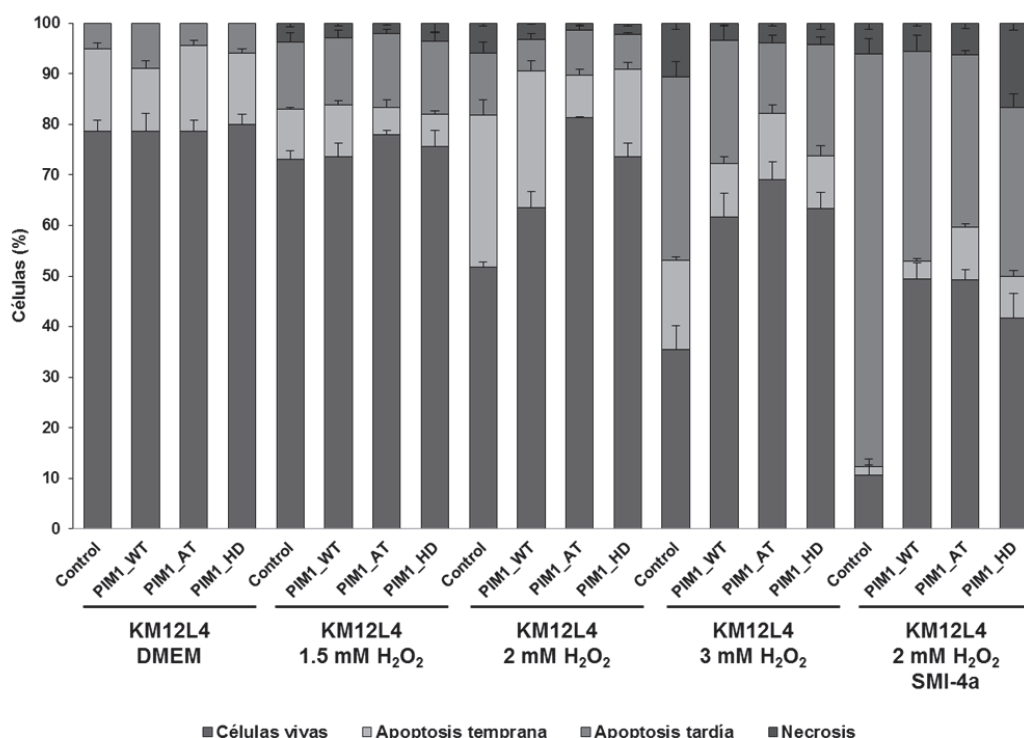
**Figura 35. La sobreexpresión del mutante Ala315Thr de PIM1 produce un aumento de las propiedades tumorigénicas en las líneas de CCR.** A) La proliferación se determinó mediante ensayo de MTT donde se cultivaron las células transfectadas durante 48 h. La densidad óptica fue significativamente mayor en las células con sobreexpresión de PIM1 Ala315Thr. B) La adhesión a matrigel de las células KM12C y KM12L4 no sufrió ningún tipo de cambio significativo a pesar de la sobreexpresión de PIM1. C) La invasión de las líneas KM12C no alcanzó un número de células que permitiese determinar si producía o no un aumento significativo. En cambio en la línea KM12L4, la sobreexpresión de PIM1 Ala315Thr y PIM1 His48Asp produjo un fuerte incremento en la capacidad de invasión de las células. Los datos de los experimentos representan la media con la desviación estándar de tres experimentos independientes. (\*,  $p < 0.1$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

En la línea celular KM12L4 se observó un aumento significativo de la proliferación en torno al 30% por la sobreexpresión del mutante Ala315Thr (p-valor < 0.01) (Figura 35A). La sobreexpresión de PIM1 con el polimorfismo His48Asp en KM12L4 produjo un aumento en la proliferación de aproximadamente el 20%, aunque no estadísticamente significativo. El resto de mutantes no influyeron en la proliferación de estas líneas celulares. En los ensayos de adhesión celular no se observó ningún cambio significativo por la transfección de PIM1 o sus mutantes, por lo que parece que no se altera ningún tipo de moléculas implicada en adhesión (Figura 35B). En cambio, en las células KM12L4 la construcción PIM1 Ala315Thr presentó un aumento significativo en la capacidad de invasión (p-valor <0.001) con respecto al control y a las otras construcciones. Además, observamos mayor invasión por la sobreexpresión de PIM1 His48Asp (p-valor <0.01) (Figura 35C). En la línea KM12C, no se observaron ningún cambio significativo en la capacidad de invasión.

Las mutaciones  $\Delta 303$  y Pro402Leu no mostraron ningún cambio significativo en los ensayos *in vitro*, presentando datos similares a los obtenidos con los tratamientos del vector vacío. Estos datos sugieren estas alteraciones podrían inactivar la actividad quinasa de PIM1. En los siguientes estudios nos vamos a centrar en las mutaciones His48Asp y Ala315Thr que producen alteraciones significativas en la proliferación e invasión celular y pueden ser las más interesantes.

#### **23.2.4.3. Alteraciones en la supervivencia celular ocasionadas por los mutantes His48Asp y Ala315Thr de PIM1**

Debido a que uno de las funciones mejor caracterizadas de PIM1 es su papel en el control de la apoptosis, se analizó el efecto en la supervivencia de la línea celular KM12L4 por la expresión de PIM1 y las variantes que mejores resultados mostraron en los experimentos previos. Se cuantificaron por citometría los niveles de apoptosis después de tratamiento con peróxido de hidrógeno a distintas concentraciones. Además, se evaluó si las mutaciones de PIM1 producen una modificación capaz de interferir en la acción del inhibidor específico SMI-4A de PIM1 (Figura 36). Los tratamientos únicamente con el inhibidor SMI-4A no presentaban ningún cambio en la supervivencia celular con respecto al no tratado, solamente cuando exponíamos a las células al peróxido de hidrógenos fuimos capaces de valorar el efecto del inhibidor.

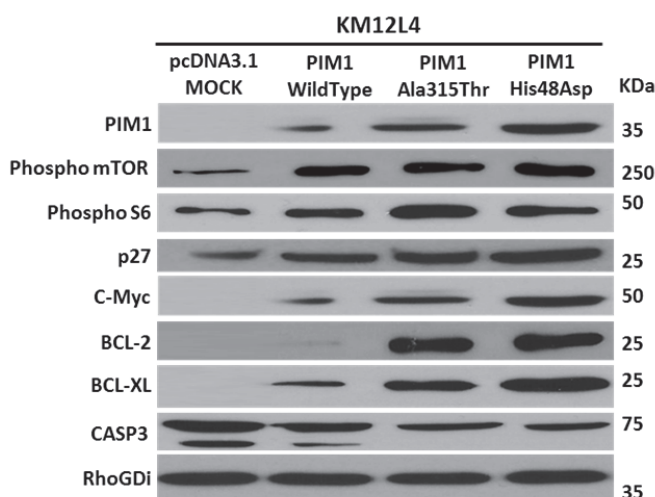


**Figura 36. Alteraciones en la supervivencia celular inducidas por los mutantes de PIM1.** Se utilizaron distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.5 a 3 mM) y el tratamiento combinado de 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el inhibidor específico de PIM1 SMI-4a (20 nM). Se analizaron los niveles de apoptosis celular por citometría de flujo y marcaje con anexina V/ioduro de propidio.

El tratamiento con 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce una resistencia a la apoptosis significativa en las líneas que sobreexpresan los mutantes de PIM1 (Ala315Thr o His48Asp). El polimorfismo His48Asp y la mutación puntual Ala315Thr, presentan un 25% y un 35% de células vivas frente al control, respectivamente. Incluso aumentando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sigue manteniendo esta proporción de supervivencia respecto al control. En cuanto a la resistencia al fármaco SMI-4a, observamos que no existen diferencias entre PIM1 y sus mutantes.

Tras los resultados obtenidos en supervivencia celular, se analizaron las vías de señalización de supervivencia mediante WB que puedan explicar las alteraciones descritas en los mutantes de PIM1 (Figura 37). Además, se analizaron vías donde participa PIM1 como las vías del control del ciclo celular (c-Myc o p27) o de procesos de proliferación o crecimiento celular (mTOR o S6). La sobreexpresión de PIM1 en la línea KM12L4 produce un aumento significativo en todas estas vías de señalización, siendo las construcciones mutantes las que presentaron mayor activación. Los niveles de BCL-2 y BCL-XL aumentaban con la

sobreexpresión de PIM1, siendo ambos mutantes los que presentaban mayores niveles de ambas BCL. Además, los mutantes inhibieron más eficazmente la apoptosis como se observa por la ausencia de activación de la caspasa 3.



**Figura 37. Análisis de la vía de señalización de PIM1 y sus variantes en células KM12L4.** Se analizan las proteínas que participan en los procesos de proliferación, ciclo celular y apoptosis, activadas por Pim1. Vemos como los mutantes His48Asp y Ala315Thr presentan una mayor activación en estas vías que la producida por la proteína wild type. Se utilizó RhoGDI como control de carga.

Por otra parte, los niveles de la vía mTOR, donde PIM1 es capaz de alterar esta vía a través de su acción sobre 4E-BP1, aumenta los niveles de fosforilación de las proteínas mTOR como de la proteína ribosomal S6. La activación de esta vía por la expresión del mutante Ala315Thr parece superior al resto, lo que explicaría que fuera la mutación que mejor resultados presentaba en los ensayos de proliferación. Respecto a proteínas que participan en la regulación del ciclo celular como c-Myc o p27, los niveles de c-Myc fueron algo superiores en las variantes mutantes, siendo en este caso los mayores niveles de activación de estas vías por la mutación His48Asp.

#### 23.2.4.4. Análisis *in silico* de los cambios estructurales de la mutación Ala315Thr

Actualmente, se conoce la estructura del dominio quinasa de PIM1 (aminoácidos 115-400). Hay 99 estructuras cristalográficas del dominio quinasa depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (101, 215). Para evaluar el efecto de la mutación Ala315Thr en la estructura de la proteína hemos utilizado el programa "Site Directed mutator"(SDM) (202). Este programa permite calcular la estabilidad de la proteína mutante frente al wild type comparando los cambios producidos en el entorno de los aminoácidos mediante una base de datos con datos experimentales para más de 1300 estructuras diferentes, realizando el cálculo de la energía

libre de plegamiento ( $\Delta\Delta G$ ) de la proteína mutante. Además, este programa puede predecir si la mutación introducida puede llegar a estar relacionada con el desarrollo de patologías, comparando los resultados obtenidos con la estabilidad de proteínas homólogas en distintas patologías (216, 217). A pesar de ser datos predictivos, este software presenta una correlación del 80% en las estabildades predichas y las obtenidas experimentalmente (218), así como del 61% de acierto en las mutaciones asociadas a patologías y verificadas experimentalmente (219, 220).

La mutación Ala315Thr se encuentra en el interior de una alfa hélice en las estructuras existentes para PIM1, siendo capaz de desestabilizar la estructura con una  $\Delta\Delta G < 2$  kcal/mol. Este valor de  $\Delta\Delta G$  se encuentra en el límite de la estabilidad de la proteína, permitiendo su viabilidad y aumentando teóricamente la flexibilidad de la proteína (Figura 38). Este cambio estructural puede estar relacionado con un aumento de su actividad catalítica (221), que correspondería con lo observado en los distintos ensayos funcionales.

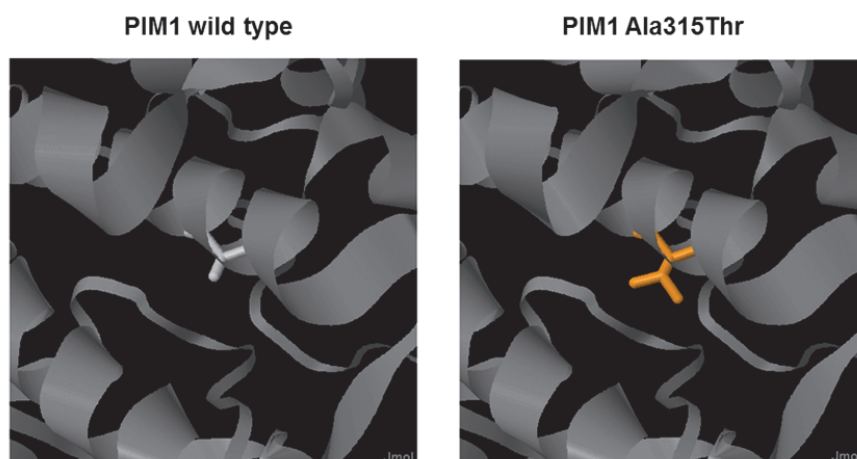
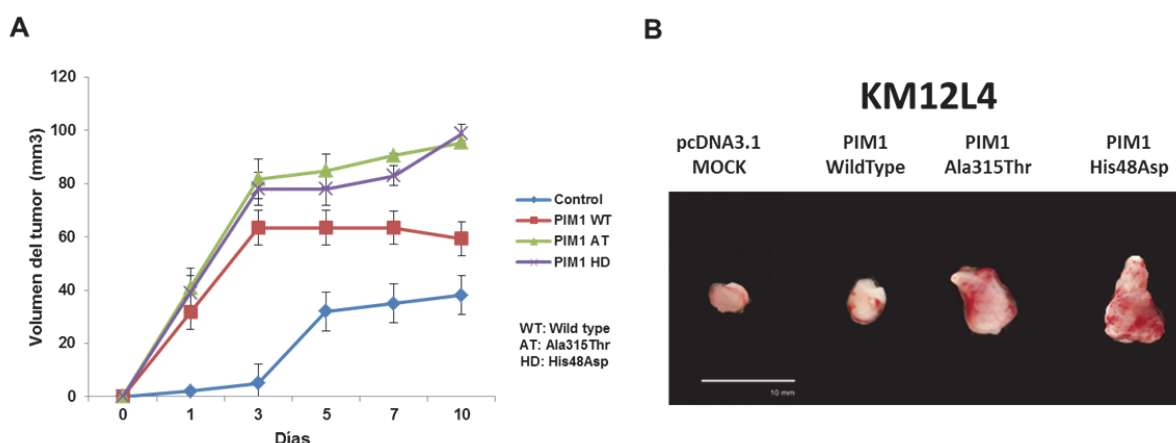


Figura 38. Modelo de predicción del cambio estructural de la mutación Ala315Thr.

#### 23.2.4.5. Efecto de la sobreexpresión de PIM1 y sus mutantes sobre las líneas tumorales *in vivo*

Finalmente evaluamos los posibles efectos *in vivo* en ratones atímicos Swiss Nude. de PIM1 wild type y los mutantes (His48Asp y Ala315Thr). Se inyectaron subcutáneamente en ratones desnudos  $5 \times 10^6$  células KM12L4 transfectadas con las variantes de PIM1, la proteína wild type o el vector vacío. Debido a que se trata de transfecciones transitorias, el estudio del crecimiento del tumor se limitó a 10 días debido a la pérdida paulatina de expresión de la proteína sobreexpresada (Figura 39).

Al igual que experimentos previos, el aumento del crecimiento tumoral está directamente relacionado con la sobreexpresión de PIM1. Las variantes produjeron un aumento significativo en la proliferación y supervivencia de las células que lo expresan. El tamaño de los tumores en el día 10 tras la inyección de las células transfectadas transitoriamente con las variantes (Ala315Thr:  $95.3 \pm 9.5 \text{ mm}^3$  y His48Asp:  $98.8 \pm 10.25 \text{ mm}^3$ ) fue significativamente superior al tamaño encontrado en los tumores con PIM1 wild type ( $59.28 \pm 4.35 \text{ mm}^3$ ) o con el vector vacío ( $38 \pm 5.58 \text{ mm}^3$ ). El tumor generado por las células que expresan PIM1 wild type fue de mayor tamaño que el de las células control, pero sensiblemente inferior al obtenido con los mutantes

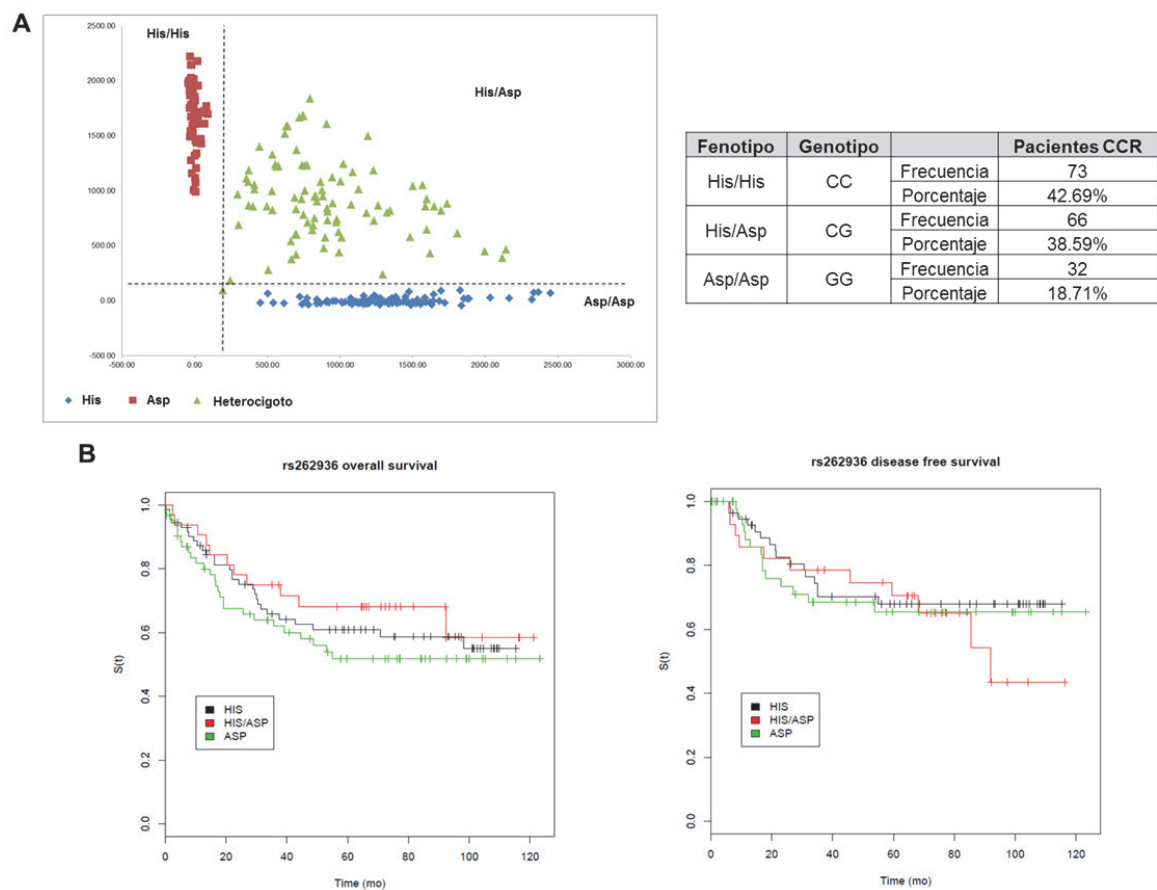


**Figura 39. Xenotransplante de líneas tumorales con sobreexpresión de PIM1 “wild type” y sus mutantes.** A) Células KM12L4 transfectadas con el vector pcDNA3.1 vacío y las distintas construcciones de PIM1 se inyectaron subcutáneamente en ratones desnudos (Swiss). Monitorizamos el crecimiento del tumor mediante inspección manual y visual durante 10 días. B) En el día 10, los animales se sacrificaron y los tumores se diseccionaron, midieron y fotografiaron. Se muestra imagen representativa de cada uno de los tumores generados.

. En conclusión, la presencia de PIM1 produce un aumento de las capacidad tumorigénicas *in vitro* e *in vivo* de las células de CCR que lo expresan. La mutación Ala315Thr y el polimorfismo His48Asp aumentan la proliferación, la invasión y la capacidad tumorigénica de estas líneas celulares de manera significativa. Dada su alta frecuencia en los pacientes de ambas mutaciones pueden ser importantes para su desarrollo como biomarcadores genéticos o el desarrollo de dianas terapéuticas específicas frente a estas variantes mutantes de PIM1.

23.2.5. El polimorfismo His48Asp de PIM1 no posee valor pronóstico en CCR

Debido a la carencia de información sobre el polimorfismo His48Asp en referencia a su valor pronóstico e impacto en la supervivencia de los pacientes de CCR, decidimos realizar un estudio de discriminación alélica mediante PCR utilizando sondas TaqMan específicas para este polimorfismo. Por colaboración con el Dr. Víctor Moreno (Instituto Catalán de Oncología) obtuvimos una serie de muestras de DNA de pacientes con CCR con seguimiento de supervivencia y tiempo libre de enfermedad a 10 años. Se analizó el efecto de este polimorfismo en el pronóstico o supervivencia, obteniendo datos para la discriminación alélica de 171 pacientes de CCR (Figura 40A).



**Figura 40. Análisis del valor pronóstico del polimorfismo His48Asp de PIM1 en CCR mediante discriminación alélica por sondas TaqMan.** A) Mediante el análisis por sondas TaqMan se caracterizó el alelo del polimorfismo His48Asp utilizando DNA de 171 pacientes de CCR con datos de 10 años de seguimiento. En la tabla aparecen las frecuencias para cada una de los fenotipos en los pacientes analizados. B) Se realizó el análisis de la supervivencia global de los pacientes y el tiempo libre de la enfermedad con los datos clínicos con un seguimiento a 10 años y su relación con el polimorfismo His48Asp.

La distribución alélica del polimorfismo fue similar a la que encontramos en la población ibérica (32%) siendo ligeramente superior en nuestro estudio con una frecuencia del 38%. Desafortunadamente, los análisis de supervivencia global y tiempo libre de enfermedad realizados, no mostraron diferencias significativas a 10 años en función de la diferente distribución alélica (Figura 40B). Ajustando los datos por edad, sexo y estadio tampoco obtuvimos diferencias significativas. A pesar de los efectos descritos en las células, parece que su uso no es adecuado como biomarcador por no presentar ninguna asociación al pronóstico de los pacientes con CCR.

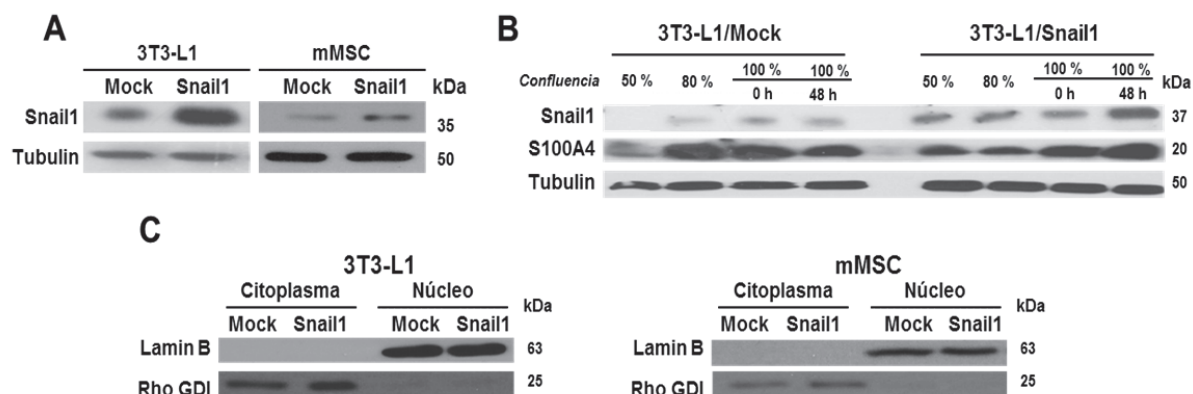


## **24. Caracterización proteómica del papel de Snail1 en la diferenciación de fibroblastos tumorales**

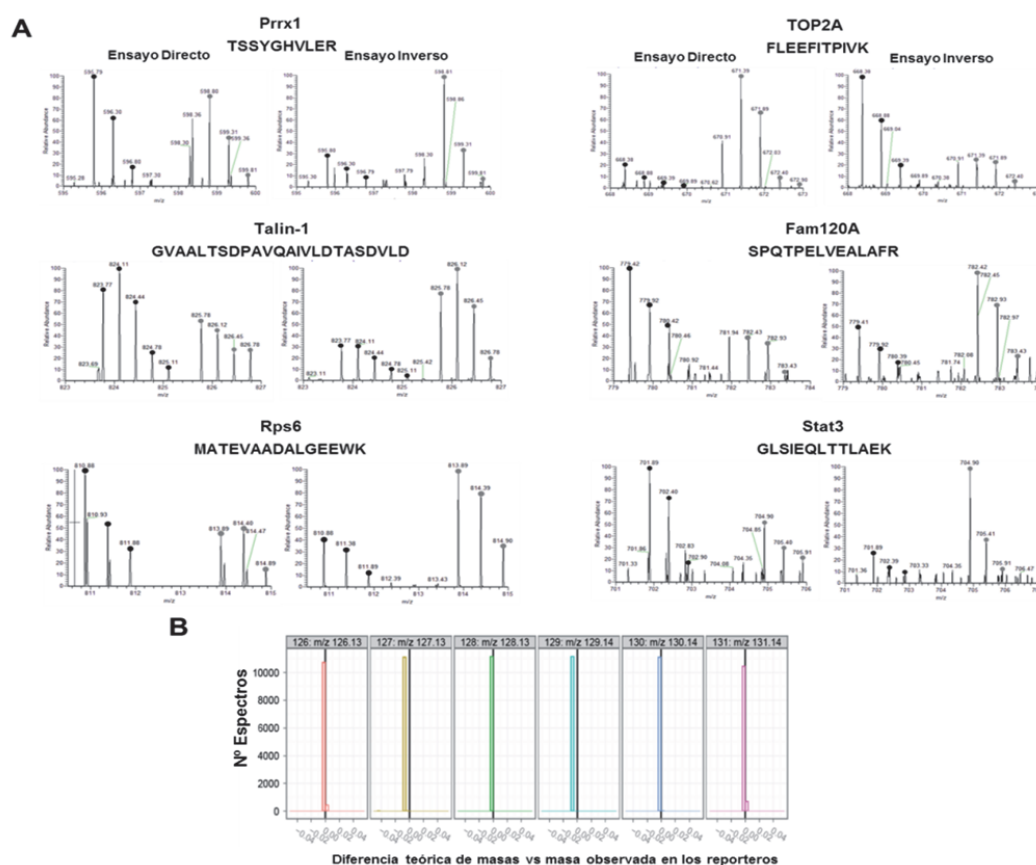
En los trabajos que conforman el segundo bloque de la Tesis Doctoral hemos intentado esclarecer los mecanismos moleculares por los que Snail1 es capaz de bloquear la adipogénesis en fibroblastos. Para identificar el papel de Snail1 sobre la inhibición de la diferenciación adipocítica hemos analizado el subproteoma nuclear de células 3T3-L1 y mMSC que sobreexpresan Snail1 aplicando herramientas proteómicas cuantitativas (SILAC y TMT).

### **24.1. Marcajes isobáricos de las líneas celulares 3T3-L1 y mMSC para su caracterización proteómica**

La sobreexpresión de las transfecciones estables de Snail1 se confirmó mediante WB en las líneas celulares 3T3-L1 y mMSC (Figura 41A). Dado que la activación de los fibroblastos es dependiente del contacto célula-célula, se testaron los niveles de Snail1 y el marcador de fibroblasto activo S100A4 a diferentes niveles de confluencia (50, 80 y 100%). La mayor expresión de estos marcadores se produjo a las 48 h después de la confluencia, momento en el cual se inician los procesos de diferenciación en estos tipos celulares, por lo que estas condiciones fueron las seleccionadas para realizar el análisis proteómico (Figura 41B). El marcaje de las células 3T3-L1 se realizó mediante marcaje metabólico en medio SILAC (Figura 14). Para el marcaje de la línea mMSC se optó por realizar un marcaje isobárico TMT 6-plex de los péptidos, debido a que no es una línea inmortalizada y que la estrategia metabólica requiere un alto número de duplicaciones (Figura 15). Se decidió analizar la fracción nuclear por considerarla la más representativa de la acción de un factor de transcripción como Snail. La calidad del fraccionamiento celular se confirmó mediante WB usando anticuerpos específicos frente a la proteína nuclear lámina B y la proteína citoplasmática RhoGDI (Figura 41C). Con el marcaje metabólico de las células 3T3-L1 se obtuvo una incorporación >97% de aminoácidos pesados calculado como se describió previamente (189). Se muestran algunos ejemplos de espectros de masas con la correcta incorporación de péptidos ligeros y pesados en los ensayos directo y reverso (Figura 42A).



**Figura 41. Expresión de Snail1 y la verificación del fraccionamiento de las muestras** mediante WB (A). B) En las células 3T3-L1 Snail1 y control se analizó a distintos niveles de confluencia. La abundancia de Snail1 y S100A4 se cuantificó por WB. La tubulina se utilizó como control de carga. En paralelo, las células mMSC se crecieron en medio normal suplementado con 10% FBS. C) La calidad del fraccionamiento subcelular se evaluó mediante WB mediante los niveles de Lamina B y Rho GDI -proteínas control de núcleo y citoplasma, respectivamente- en las fracciones citoplasmática y nuclear mediante WB.

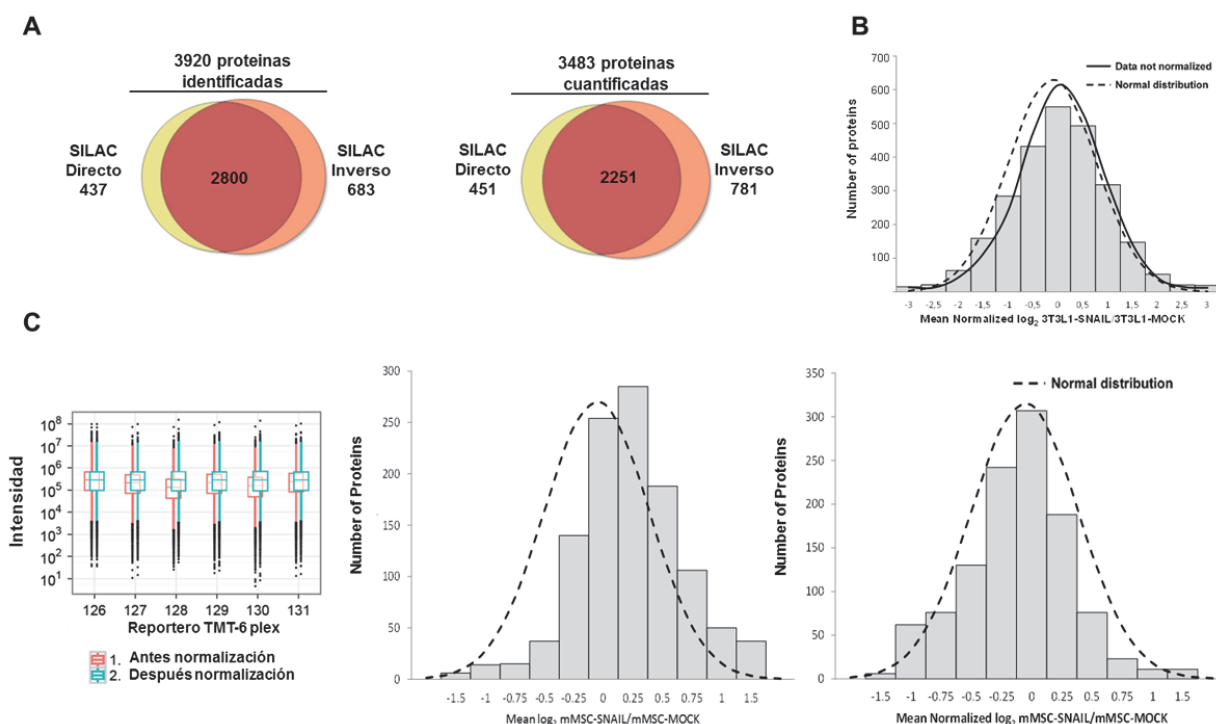


**Figura 42. Evaluación del marcaje en las líneas 3T3-L1 y mMSC.** A) Verificación de la incorporación de los péptidos ligeros y pesados en ambos ensayos de la línea 3T3-L1. Se pueden observar las envolturas isotópicas de seis péptidos correspondientes a seis proteínas diferentes que posteriormente se validaron mediante otras técnicas. B) Verificación del correcto marcaje en los péptidos de las distintas muestras con los reporteros del TMT.

Se verificaron la correcta masa/carga de los reporteros unidos a los péptidos en las distintas muestras y sus niveles de intensidad (Figura 42B).

## 24.2. Normalización de los datos y proteínas alteradas por Snail1

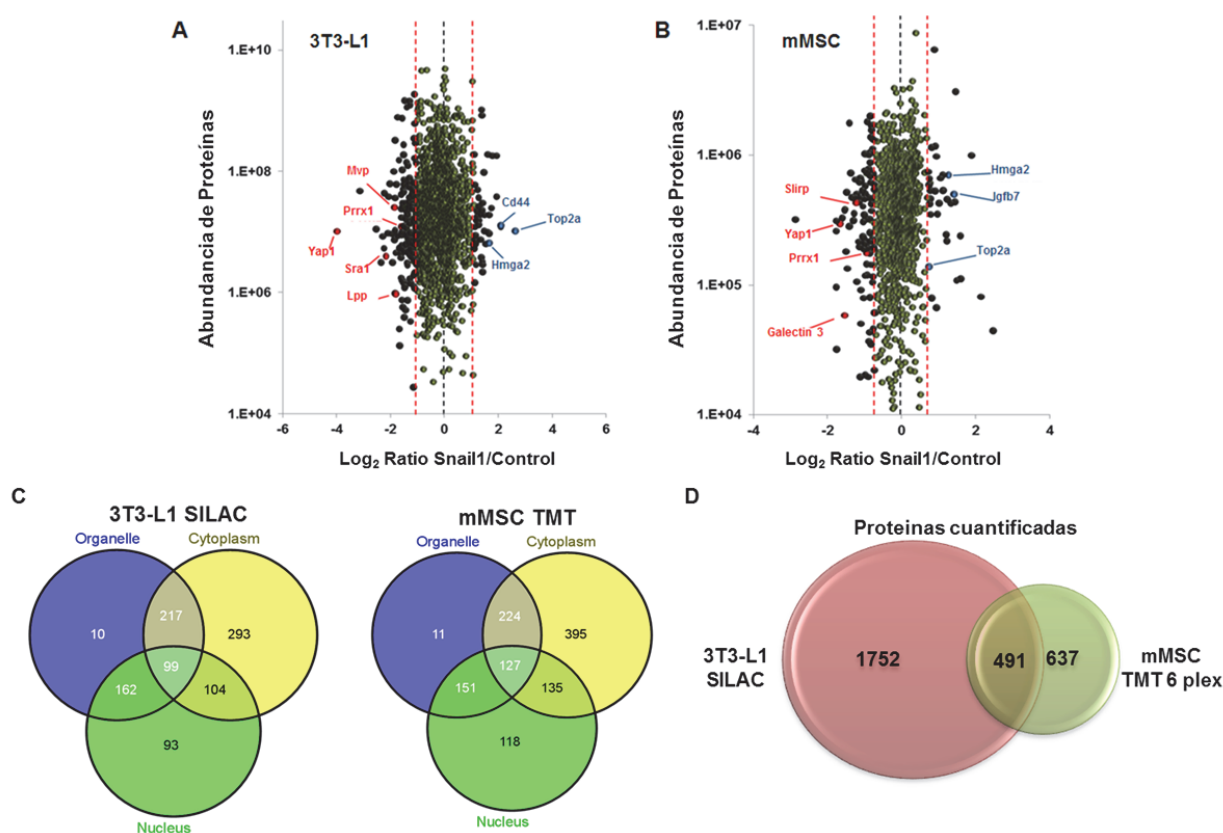
Mediante análisis SILAC de la línea celular 3T3-L1 se identificaron 3920 proteínas entre el marcaje directo e inverso, de las cuales 2800 eran comunes. Se cuantificaron 3483 proteínas, con 2251 proteínas comunes. (Figura 43A). Los datos se normalizaron frente a una media truncada en un 5%, de manera que se minimiza el efecto de los valores extremos, y centramos la distribución del ratio logarítmico en cero (Figura 43B). Usamos como cambio significativo para las proteínas desreguladas con un valor de cambios mayores a 1.5, que se obtuvo mediante un test estadístico basado en la permutación de los péptidos cuantificados (192). Se obtuvieron 574 proteínas desreguladas por Snail1 como significativas con cambios superiores a 1.5, en el núcleo de las células 3T3-L1.



**Figura 43. Proteínas identificadas y cuantificadas en células con sobreexpresión de Snail1.** A) Proteínas identificadas y cuantificadas en los experimentos directo e inverso del SILAC de las células 3T3-L1. B) Normalización de los datos SILAC mediante la media truncada que permite ajustar de manera más eficiente los datos a la distribución normal. C) La intensidad de los reporteros TMT se normalizó frente a la media, permitiendo una optimización de los datos obtenidos en el TMT 6-plex para las células mMSC.

En total encontramos 111 proteínas sobreexpresadas y 463 reprimidas en la fracción nuclear de las células 3T3-L1 que sobreexpresan Snail1 frente a las células control (Figura 44A) (Tabla Suplementaria 2).

Tras el marcaje de las células mMSC con TMT 6-plex, se identificaron 1136 proteínas en la fracción nuclear. Los datos se normalizaron usando EasyProt (222). Este software calcula, para cada uno de los canales del TMT, la abundancia de cada péptido dividida entre la suma de la abundancia correspondiente a ese péptido en todos los canales (Figura 43C).



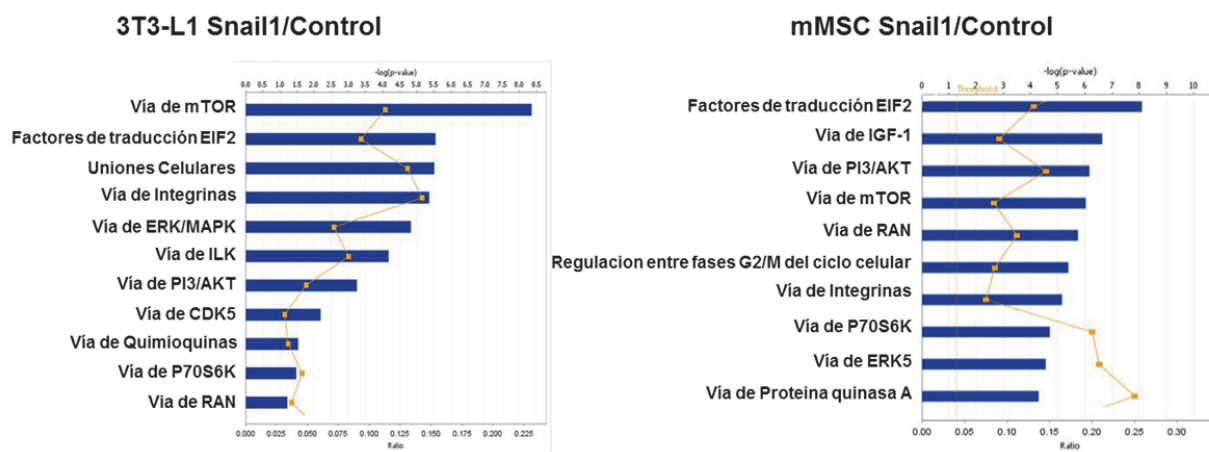
**Figura 44. Proteínas cuantificadas en el extracto celular de las células 3T3-L1 y mMSC con sobreexpresión de Snail1.** A) Distribución de los log ratios de las proteínas frente a su abundancia en las células 3T3-L1 Snail1 y control en el ensayo de SILAC y B) en las células mMSC para el ensayo de TMT 6 plex tras normalizar ambos ensayos proteómicos. Las proteínas inhibidas y sobreexpresadas se representan en negro, rojo y azul, respectivamente. Las proteínas que no presentan cambios significativos se muestran en verde. C) Proteínas diferencialmente reguladas según su localización subcelular determinada de acuerdo a DAVID. D) Diagrama de Venn proporcional con la representación del solapamiento de las proteínas cuantificadas en común en ambos estudios.

Este tipo de normalización permite eliminar las pequeñas diferencias que pudiese presentar el material de partida entre las distintas muestras. Además, para cada canal se tiene en consideración el factor de corrección del marcaje isobárico que es facilitado por el fabricante, este factor es necesario para realizar la normalización final. EasyProt determinó como valor significativo los cambios superiores a  $\geq 1.23$  en la expresión de las proteínas por efecto de Snail1. Con este punto de corte, obtuvimos un total de 391 proteínas desreguladas, con 97 sobreexpresadas y 294 reprimidas (Figura 44B) (Tabla Suplementaria 3). Globalmente, considerando ambos estudios, vemos un mayor número de proteínas reprimidas, en concordancia con el hecho de que Snail1 es principalmente un represor transcripcional.

El número de proteínas nucleares asignadas por DAVID (205) fue de 458 frente a un total de 2251 cuantificadas en 3T3-L1, y de 531 de las 1136 de las mMSC, confirmando el enriquecimiento de la fracción nuclear mediante el fraccionamiento subcelular utilizado (Figura 44C). En total, se cuantificaron 491 proteínas comunes en ambos experimentos a pesar de las diferencias experimentales y de tratarse de líneas celulares diferentes (Figura 44D).

### 24.3. Análisis de las vías de señalización celular alteradas por la sobreexpresión de Snail1

Con las proteínas desreguladas en ambos estudios se realizó el análisis bioinformático, con Ingenuity Pathway Analysis (IPA), para determinar qué funciones se encontraban alteradas y qué proteínas podrían ser claves en las distintas vías de señalización (Figura 45).



**Figura 45. Vías de señalización alteradas por la sobreexpresión de Snail1.** Por IPA se identificaron las vías alteradas más significativas en 3T3-L1 y mMSC. Existen bastantes vías comunes en ambos ensayos como la vía de señalización de mTOR, integrinas o el transporte mediado por RAN.

En ambas líneas, destaca la alteración en la vía de señalización mTOR y la señalización de iniciación de la traducción proteica mediada por los factores de elongación eIF2 (Figura





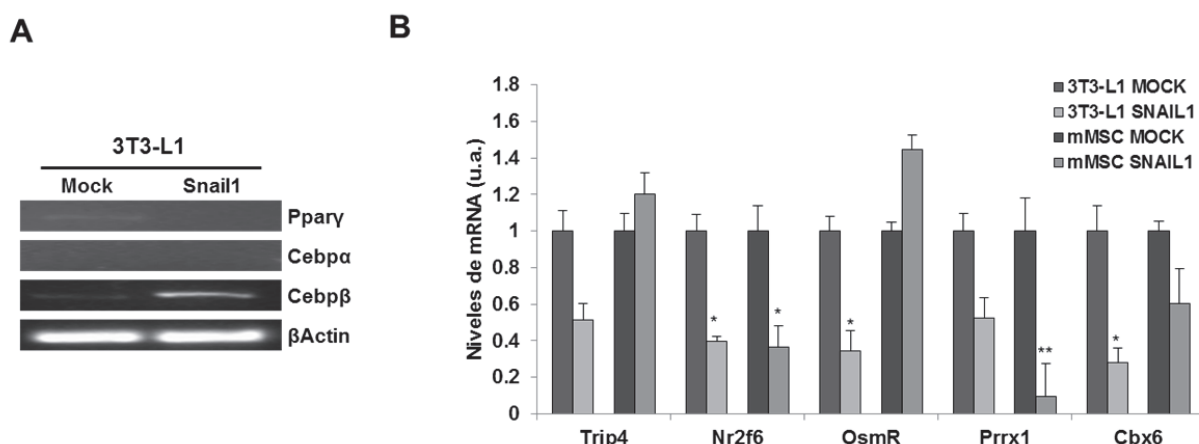
Por otro lado, se encontraron también un gran número de factores de transcripción reprimidos como Stat1, Stat3, NfκB, Trip4, Nr2f6, Prrx1 y Sra1 (un componente del complejo ribonucleoproteico coactivador Nco1) y proteínas relacionadas con Src, como c-Src, Fam120a, Sh3bp1, Lipb1 y Tln1. Además, encontramos reprimidas β-catenina, Gsk3β y Yap1 que participan en la diferenciación celular. Destaca la fuerte represión de Yap1 en el núcleo de ambas líneas celulares por Snail1, Yap1 es junto al factor Taz los factores de transcripción controlados por la vía de señalización Hippo. El aumento de Yap1 en el núcleo de las células se ha relacionado con el control del tamaño de los órganos y la pluripotencia en células madre embrionarias y mesenquimales (224, 225).

Respecto a los mediadores directos de adipogénesis, encontramos un incremento de los niveles de C/EBPβ por Snail1 en las células 3T3-L1. Además, gracias a los datos que aporta el estudio proteómico IPA predijo la represión de los niveles de PPARγ y la sobreexpresión en C/EBPβ. Se identificaron 47 proteínas desreguladas que participan directa o indirectamente en la señalización de estos dos factores de transcripción (Figura 46C).

El incremento del factor de transcripción C/EBPβ sugiere que la expresión de Snail1 no afecta a las fases iniciales de la diferenciación donde se produce la fase de expansión mitótica clonal previa a la diferenciación final. Este dato concuerda con el aumento de proliferación que se observa en los fibroblastos que sobreexpresan Snail1. Esta mayor proliferación podría ser la causa por la que estos fibroblastos expresando Snail1 tienen la capacidad de formar sarcomas (139).

#### **24.4. Validación de las proteínas alteradas implicadas en la diferenciación adipocítica**

A continuación procedimos a validar las proteínas identificadas y las predicciones bioinformáticas mediante PCR y WB. En primer lugar, comprobamos por RT-PCR semicuantitativa los niveles de C/EBPα, C/EBPβ y PPARγ, tres factores críticos en adipogénesis (Figura 47A). Los niveles de C/EBPβ estaban claramente aumentados por la expresión de Snail1, mientras que de C/EBPα y PPARγ no se detectaron en ninguna de las dos líneas celulares.

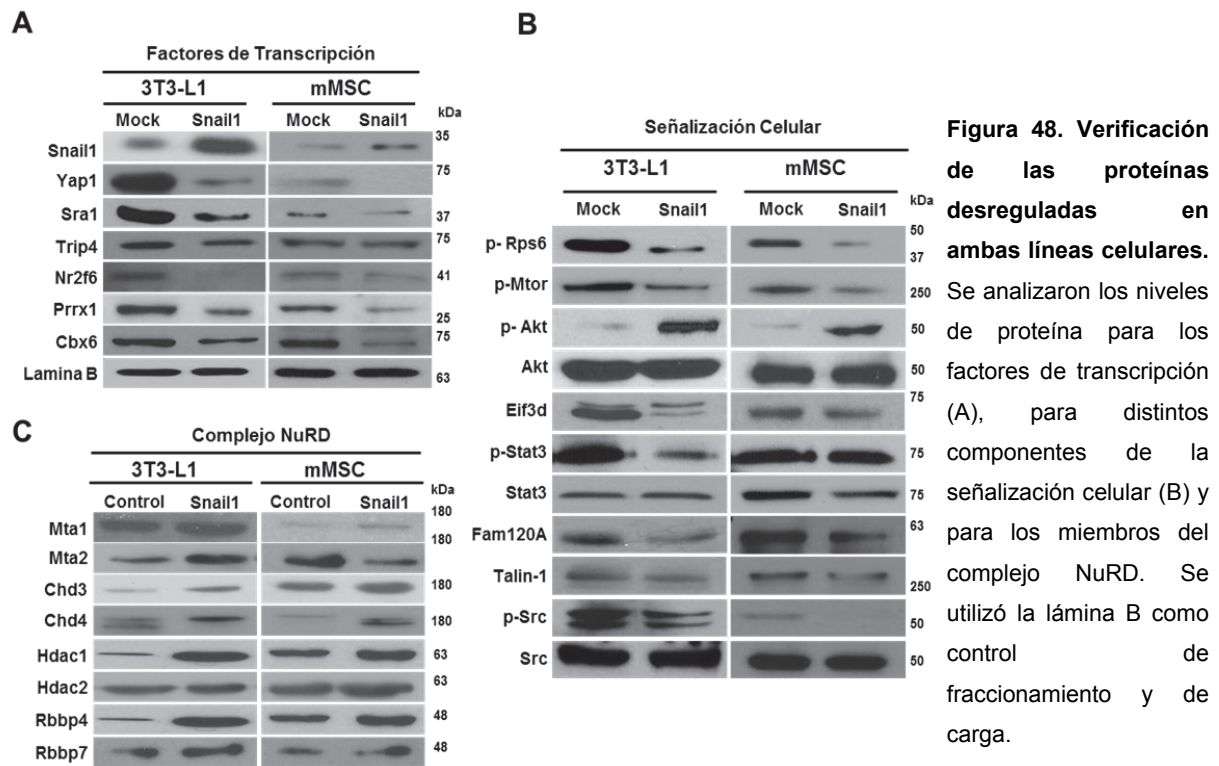


**Figura 47. Validación de las proteínas desreguladas mediante PCR.** A) El cDNA sintetizado a partir de RNA procedente de las células 3T3-L1 se utilizó en la RT-PCR semicuantitativa para el análisis de los factores PPAR $\gamma$ , c/EBP $\alpha$  y c/EBP $\beta$ . B) PCR cuantitativa de los factores de transcripción Trip4, Nr2f6, OsmR, Prrx y CBX6 en ambos tipos celulares. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos.

También, verificamos por PCR cuantitativa los niveles de expresión de algunos factores de transcripción que podrían participar en la inhibición de la diferenciación producida por Snail1 tanto en 3T3-L1 como en mMSC. Se analizaron los niveles de Trip4, Nr2f6, Prrx1, Cbx6 y el receptor OsmR (Figura 47B). Verificamos la represión en ambas líneas celulares para Cbx6, Nr2f6 y, principalmente, para Prrx1. En cambio, no detectamos cambios en la expresión de Trip4 y un efecto contrario al esperado para el receptor OsmR por la acción de Snail1 en las células mMSC. Estas diferencias podrían deberse a las propiedades de célula madre de las células mMSC respecto de un estado más diferenciado de las 3T3-L1.

A continuación, mediante WB pudimos comprobar que los niveles de los factores de transcripción descritos en la qPCR coinciden también a nivel de proteína (Figura 48A). Se verificó la fuerte caída de Sra1 y Yap1 en las fracciones nucleares de ambas líneas. Destacó también la fuerte inhibición de Prrx1 por la expresión de Snail1, como habíamos visto a nivel de mRNA. Se validaron algunas vías de señalización que aparecían alteradas en ambas líneas celulares (Figura 48B). Confirmamos la represión de la vía de mTOR por la disminución de la fosforilación de la proteína RP6 y de mTOR. También se verificó el aumento en la fosforilación de la Ser473 de Akt, como se ha descrito previamente (136). El aumento en la fosforilación de Akt y la caída de mTOR indicarían que la isoforma inhibida es mTORC1, dado que mTORC2 participa en la fosforilación de la Ser473 de Akt que observada por WB. Como consecuencia de la inhibición de mTORC1 observamos la represión de la proteína eIF3D, componente del complejo multiproteico eIF3 que interacciona con el complejo eIF2 para la iniciación de la traducción proteica, proceso activado por la vía de señalización de mTORC1-RPS6.



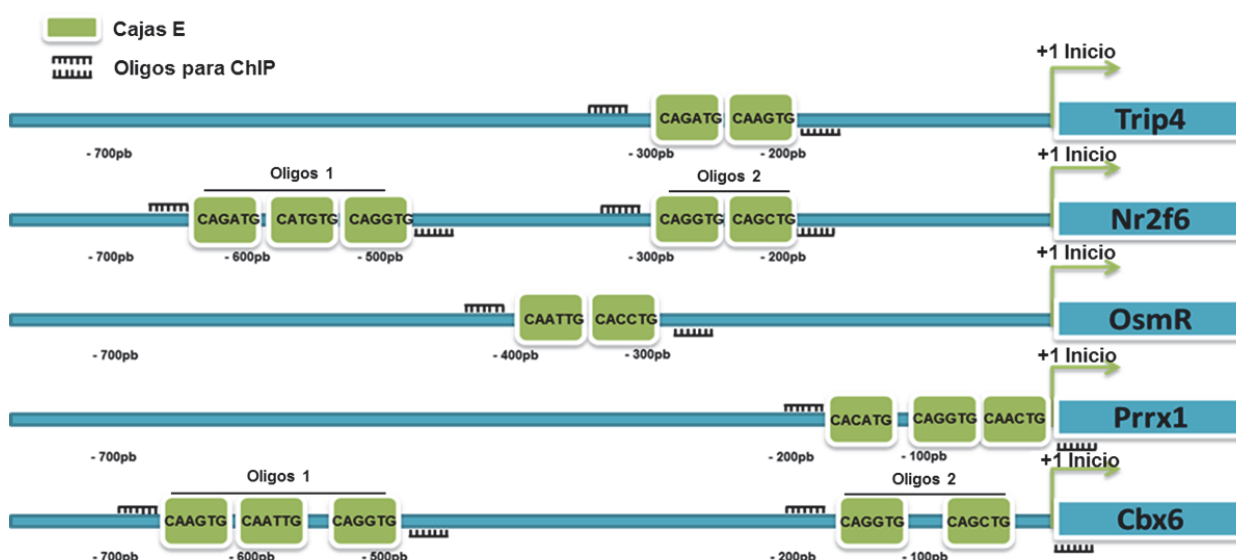


En el estudio de las células 3T3-L1 se detectaron múltiples alteraciones en proteínas de uniones celulares, por lo que también analizamos los niveles de Fam120A y Talina1, que participan activamente en la formación de estas uniones, verificando su represión en ambas líneas celulares. Src fosforilado se encuentra reprimido, en concordancia a la inhibición de proteínas relacionadas con Src en los estudios proteómicos.

También, se evaluó el complejo NuRD inducido por Snail1 (Figura 48C). Se observó un aumento de expresión de todos los componentes en ambas líneas celulares, excepto HDAC2, MTA2 y RBBP7. NuRD puede actuar como un activador o represor transcripcional, interactuando con diferentes factores de transcripción dependiendo de la composición de los componentes de NuRD y de las modificaciones post-traduccionales que estos presenten (226). En los datos proteómicos de las células 3T3-L1 observamos un aumento de MBD2, que dentro del complejo es el encargado de unirse al DNA hipermetilado para su silenciamiento. Cuando MBD2 forma parte del complejo NuRD se le conoce como MeCP1 (227), siendo este el complejo que puede estar regulado por la expresión de Snail1.

## 24.5. El análisis *in silico* de los promotores revela proteínas y factores de transcripción cuya expresión es controlada por Snail1

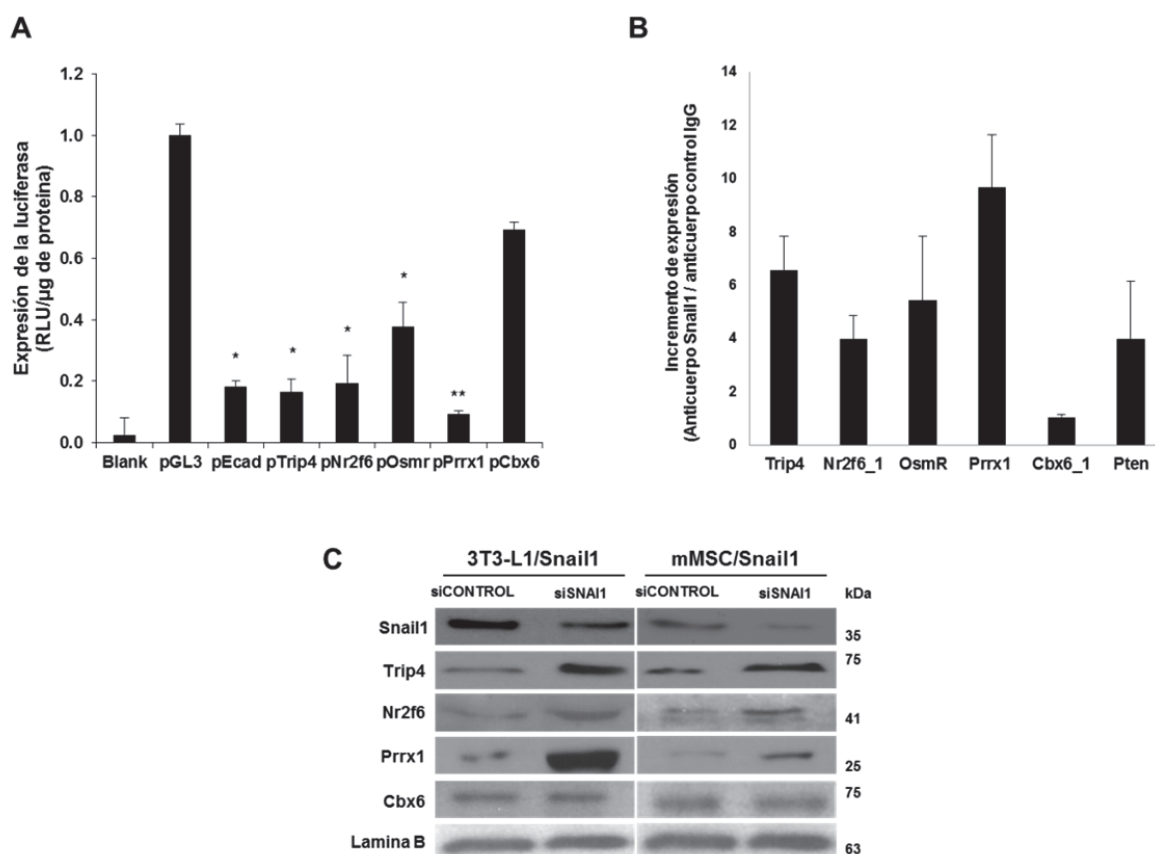
Analizamos los factores de transcripción que pudiesen estar reprimidos de manera directa por Snail1 y así identificar aquellos que participasen directamente en la diferenciación celular. Siguiendo la metodología descrita, identificamos los sitios de unión de Snail1 al motivo “caja E” presente en los promotores de distintos genes. Para la búsqueda de estos sitios de unión en nuestras proteínas desreguladas, realizamos un análisis *in silico* con MatInspector (Genomatix), que contiene librerías de matrices con sitios de unión de factores de transcripción. De esta manera identificamos 28 proteínas cuantificadas con sitios de unión tipo “caja E” (Tabla Suplementaria 4). Posteriormente comparamos los resultados obtenidos con la base de datos TRED (Transcriptional Regulatory Element Database), donde se encuentran las secuencias del promotor, lo que nos permitió definir con exactitud los posibles sitios de unión de Snail1. Finalmente, nos centramos en los promotores de aquellos factores de transcripción alterados cuya expresión habíamos verificado previamente: Trip4, Nr2f6, OsmR, Prrx1 y Cbx6, presentan varios potenciales sitios de unión para Snail1 en los promotores de sus genes (Figura 49).



**Figura 49. Diagrama de los promotores de los factores de transcripción reconocidos por Snail.** Se señalan los motivos E-box y los primers utilizados para ChIP. Los datos sobre las 28 proteínas de MatInspector se obtuvieron de la base de datos TRED.

Para analizar experimentalmente la unión de Snail1 a estos sitios de unión, clonamos dichos promotores en el vector de luciferasa pGL3. Una vez verificado el clonaje mediante secuenciación, llevamos a cabo un ensayo de luciferasa usando el promotor de la E- cadherina

como control del experimento (Figura 50A). Snail1 inhibió la actividad de luciferasa con los promotores de Trip4, Nr2f6, OsmR y Prrx1, mientras que los cambios fueron muy leves para Cbx6. La capacidad de represión de los promotores de Trip4 y Prrx1 fue superior a los de E-cadherina, iguales para Nr2f6 y más baja para Cbx6 y OsmR.



**Figura 50. Análisis de la unión de Snail1 a los promotores seleccionados y efecto del silenciamiento de Snail1.** A) Las células 3T3-L1 se transfectaron con los promotores clonados en el vector de luciferasa pGL3, usando el promotor de la E-cadherina como control. Los datos representan la media de la actividad de la luciferasa incluyendo la desviación estándar de tres experimentos independientes comparados con las células control. (\*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). B) Para confirmar la unión de Snail1 a los promotores, se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando un anticuerpo específico para Snail1. PTEN se utilizó como control positivo. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos. C) Análisis por WB de la reversión de la expresión de los factores de transcripción indicados mediante el silenciamiento de Snail1. Se utilizó lámina B como control de carga.

La unión de Snail1 a estos promotores se confirmó por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con un anticuerpo anti-Snail1 y un anticuerpo irrelevante como control. En la amplificación por qPCR se utilizó la secuencia de PTEN como control positivo de la inmunoprecipitación (118) (Figura 50B). Snail1 se unió a todos los promotores que contenían

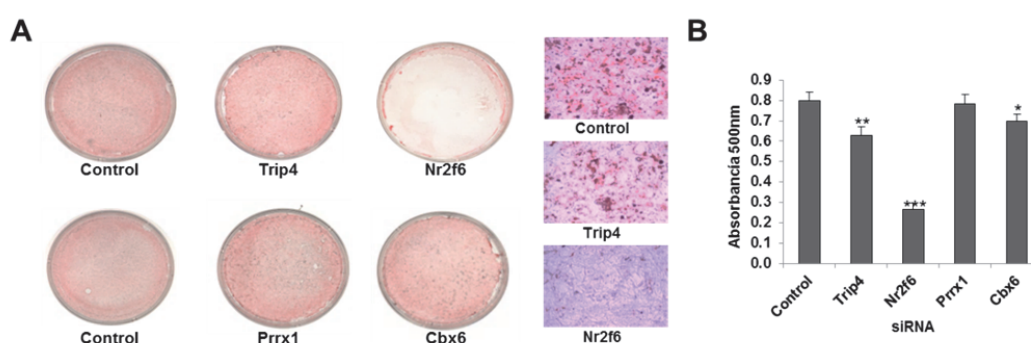
dominios E-box, mostrando un incremento en la unión a los promotores de Trip4, Nr2f6, OsmR y Prrx1 superior o igual a la del control positivo PTEN. Los mayores valores se obtuvieron para Prrx1, mientras que Cbx6 apenas presenta unión específica de Snail1.

Finalmente, para verificar la capacidad de Snail1 de unirse al promotor y controlar la expresión de estas proteínas, se realizó un silenciamiento transitorio de Snail1 en las células 3T3-L1 y mMSC transfectadas con Snail1. Aunque el silenciamiento de Snail1 no fue total, se apreció un claro aumento de Nr2f6, Trip4 y, sobretodo, Prrx1 en ambos tipos celulares (Figura 50C).

En conjunto, estos resultados demuestran un efecto directo de Snail1 sobre la regulación de los promotores de Nr2f6, Trip4 y Prrx1.

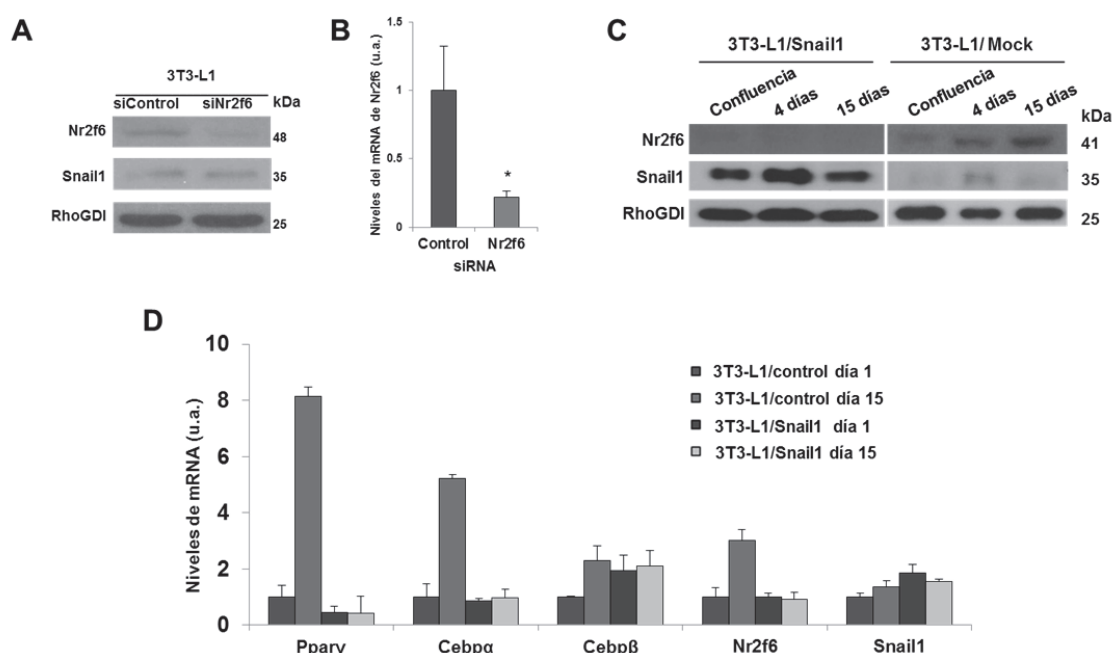
#### 24.6. La represión de Nr2f6 controla la diferenciación adipogénica

Para evaluar el impacto y papel Prrx1, Nr2f6, Trip4 y Cbx6 en la diferenciación adipocítica, realizamos ensayos de silenciamiento de en células 3T3-L1 mediante siRNAs específicos, antes y durante su diferenciación. Los cambios en el contenido lipídico después de cultivar las 3T3-L1 con el cóctel de diferenciación, se monitorizaron por tinción con Oil Red O, tras la rotura de las células con isopropanol (Figura 51). Se observó una completa inhibición de la diferenciación cuando se reduce la expresión de Nr2f6. También se observó una ligera represión de la adipogénesis tras el silenciamiento de Trip4, aunque a un nivel menor que para Nr2f6. Como control se comprobó el silenciamiento de Nr2f6 mediante WB (Figura 52A) y PCR cuantitativa (Figura 52B) a las 48 h post-transfección.



**Figura 51. El silenciamiento de Nr2f6 inhibe la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1.** A) Las células preadipocíticas 3T3-L1, se transfectaron con siRNAs para Trip4, Nr2f6, Prrx1, Cbx6 y control. A los diez días de tratamiento con el cóctel adipogénico, las células se tiñeron con Oil Red O. Las fotografías se tomaron con un microscopio Olympus CK40 equipado con una cámara Olympus DP12 a un aumento de 40x. B) Las células teñidas con Oil Red se trataron con isopropanol y la tinción se cuantificó por absorbancia a 500nm. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos llevados a cabo por duplicado. \*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Tras confirmar que el silenciamiento de Nr2f6 provocaba inhibición de la adipogénesis, evaluamos su expresión durante el proceso de adipogénesis, desde que las células se encuentran indiferenciadas (cuando alcanzan la confluencia) hasta que se produce una diferenciación final del 70-80% de adipocitos presentes en la placa, 15 días después de inducir la diferenciación. Cuando se analizaron los niveles de Nr2f6 mediante WB (Figura 52C), se observó que la expresión de Nr2f6 aumentaba a medida que se produce la diferenciación en células 3T3-L1 control. En cambio, en las células que expresan Snail1 se mantiene reprimida su expresión al igual que la diferenciación.

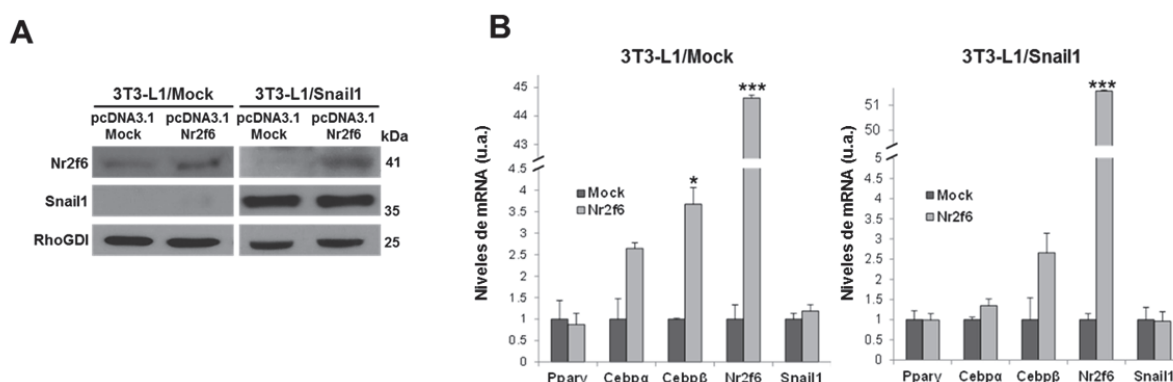


**Figura 52. Expresión de Nr2f6 y otros mediadores durante la adipogénesis.** A) Células 3T3-L1 se transfectaron con siRNA y la expresión de Nr2f6 se valoró por WB, y B) qPCR. C) Expresión de Nr2f6 y Snail1 a distintos tiempos de la diferenciación. Los niveles de RhoGDI se utilizaron como control de carga. D) El RNA extraído de las células Snail1 y control al inicio y al final de la diferenciación se utilizó para sintetizar cDNA y comparar los niveles de Snail1, Nr2f6, PPAR $\gamma$ , c/EBP $\alpha$  y c/EBP $\beta$  mediante qPCR. El RNA 18S ribosomal murino se utilizó como control de carga.

Por otra parte, mediante qPCR determinamos los niveles de los reguladores de la adipogénesis (Figura 52D), se observó que los mediadores adipogénicos PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  al igual que Nr2f6 se encuentran reprimidos por la expresión de Snail1 respecto de las células 3T3-L1 control, excepto el marcador c/EBP $\beta$  que no se reprime por Snail1. Por lo que concluimos que el control de Snail1 sobre c/EBP $\beta$  es completamente independiente de Nr2f6, reforzando la hipótesis de su importancia para el mantenimiento de una constante expansión mitótica clonal, responsable del aumento en la proliferación y su posible implicación en la formación de sarcomas.

### 24.7. La sobreexpresión de Nr2f6 promueve la adipogénesis

A continuación, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de Nr2f6 en 3T3-L1 Snail1 y control. Para ello, subclonamos Nr2f6 en el vector pcDNA3.1, la cantidad de vector utilizado en este ensayo fue inferior a la habitual debido al aumento de muerte celular que produjo la expresión de Nr2f6. Se ajustaron las condiciones de transfección a 1 µg de DNA por cada  $5 \times 10^6$  células. La sobreexpresión de Nr2f6 se verificó por WB (Figura 53A) y qPCR (Figura 53B).

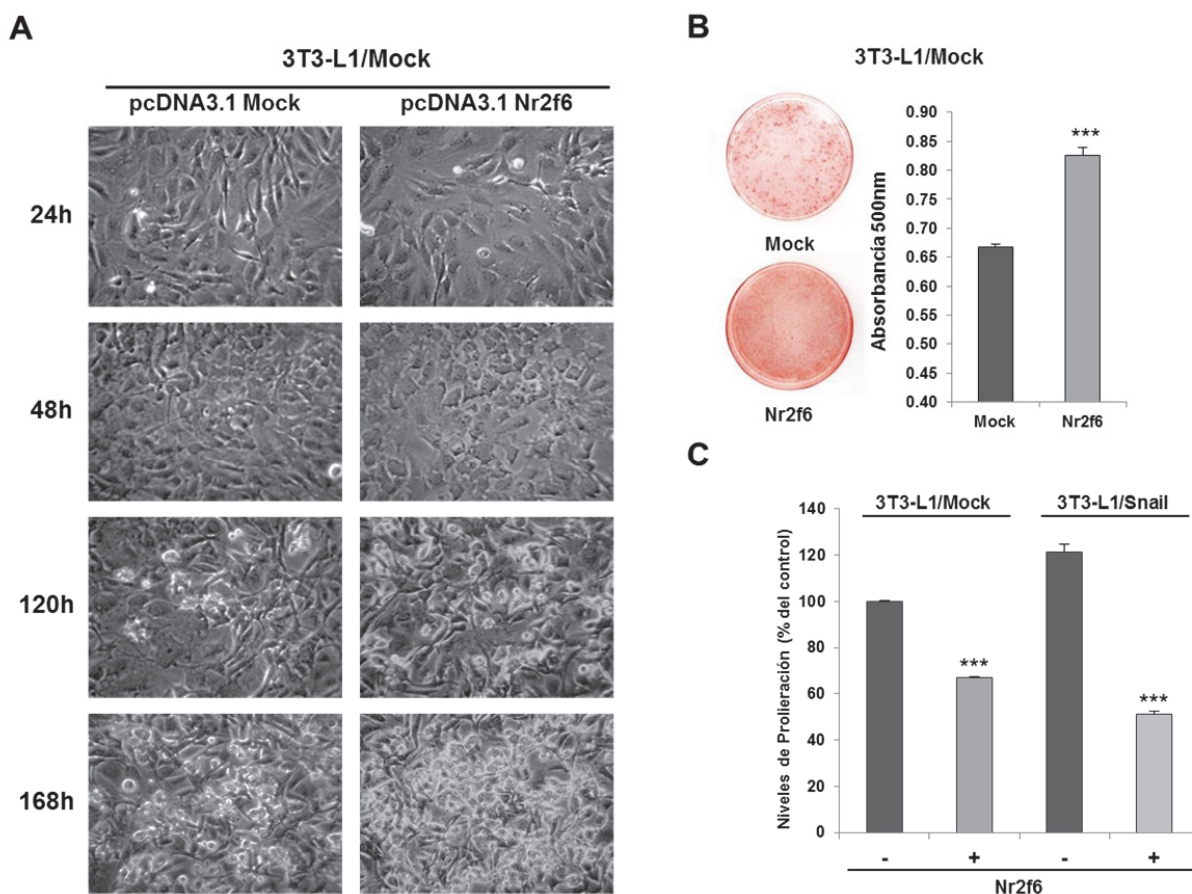


**Figura 53. La sobreexpresión de Nr2f6 revierte los efectos de Snail1 en la diferenciación.** A) Las células 3T3-L1 control y Snail1 se transfectaron con pcDNA3.1-Nr2f6 o el vector vacío y se analizaron por WB para verificar los niveles de Snail1 y Nr2f6. B) Se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA de las células transfectadas para su uso en qPCR para el análisis de los factores de transcripción Snail1, Nr2f6, PPARγ, c/EBPα y c/EBPβ. Usamos el RNA 18S ribosomal murino como control de carga.

Como vemos en ambas aproximaciones, los niveles de Snail1 no se alteraron por la expresión de Nr2f6. Sin embargo, vemos un importante incremento de c/EBPα y c/EBPβ en las células 3T3-L1 control transfectadas con Nr2f6. La expresión de Snail1 inhibió casi totalmente el aumento de c/EBPα producido por Nr2f6. La represión de PPARγ en todos los casos sugiere que es necesaria la participación de factores adicionales a Nr2f6 en la diferenciación celular.

Para observar el aumento del número de células diferenciadas por la acción de Nr2f6 se tomaron imágenes del cultivo a distintos tiempos (Figura 54A). Durante la diferenciación adipocítica de las 3T3-L1 que sobreexpresaban Nr2f6 se observó un aumento de gotas lipídicas en el interior de estas células, así como un incremento del número de células diferenciadas en comparación con las células no transfectadas.





**Figura 54. La expresión de Nr2f6 induce un aumento en la diferenciación de las células 3T3-L1.** A) Células transfectadas con el vector de sobreexpresión de Nr2f6 a distintos tiempos. Imágenes tomadas con un microscopio Olympus CK40 equipado con una cámara Olympus DP12 a un aumento de 40x. B) Las células transfectadas se tiñeron tras 7 días de diferenciación. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos llevados a cabo por duplicado. \*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . C) Ensayos de MTT para evaluar cambios en la proliferación debidos a la sobreexpresión de Nr2f6 (\*\*\*:  $p < 0.001$  comparado con las células 3T3-L1 control.)

Para la visualización y cuantificación de la diferenciación, se realizó la tinción con Oil Red O (Figura 54B). Los resultados de la colorimetría confirmaron la existencia de un incremento significativo en la adipogénesis de las células que expresaban Nr2f6. Otro efecto que observamos tras la transfección de Nr2f6 fue una disminución significativa de la capacidad de proliferación tanto en las células 3T3-L1 Snail1 como control (Figura 54C). Esta bajada contrasta con el aumento de la proliferación que se observa por la expresión de Snail1. Podría pueda estar relacionada con el incremento en muerte celular causada por la expresión de Nr2f6. Conviene destacar que la transfección de las células 3T3-L1 Snail1 con Nr2f6 produjo un gran incremento de muerte celular que imposibilitó llevar a cabo experimentos de diferenciación.

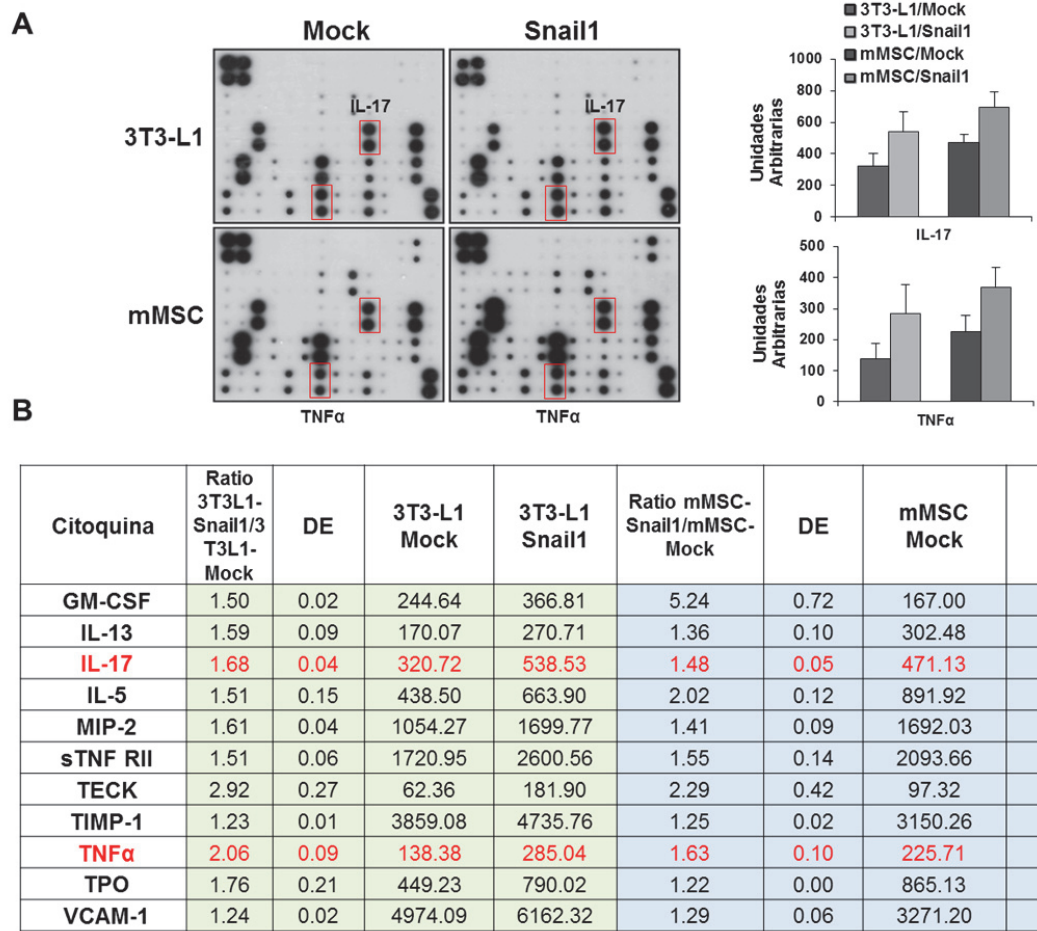
#### 24.8. Snail1 regula los niveles de IL-17 a través del control directo de Nr2f6

Se ha descrito la capacidad de Nr2f6 de actuar como represor de la expresión de IL-17 en células Th17 (228, 229). Estos datos coinciden con los niveles observados para Nr2f6 en la adipogénesis de las 3T3-L1 Snail1. Para determinar si el efecto observado de Nr2f6 en la adipogénesis estaba mediado por IL-17 u otras citoquinas, se usó un microarray de citoquinas para analizar los medios condicionados de las células 3T3-L1 y mMSC transfectadas con Snail1 y control (Figura 55A). Tras realizar el análisis de imagen, se determinaron los niveles de 62 citoquinas cuyos anticuerpos estaban impresos en el array. Se encontraron alteraciones en 38 citoquinas en el mismo sentido para ambos tipos celulares (Tabla suplementaria 5), por lo que podrían tener un papel en los procesos de diferenciación mediados por Snail1 (Figura 55B). Entre otras, se encontraron diferencias significativas en la expresión de IL-17 y TNF $\alpha$  en ambos tipos celulares. Los perfiles de citoquinas de ambas líneas celulares son muy similares, solo difieren en la presencia de la expresión de MIP-3 $\beta$  en 3T3-L1 y CXCL16 en mMSC. El resto de citoquinas presentan niveles muy similares. La sobreexpresión de Snail1 produce un aumento en los niveles de prácticamente todas las citoquinas en mMSC, por el contrario en las células 3T3-L1 también se producen represiones en un 10% de las citoquinas analizadas. En general, las alteraciones producidas en los niveles de las citoquinas por la expresión de Snail1 son moderados. Para confirmar estos datos, se cuantificó IL-17 en el medio condicionado de por ELISA (Figura 56A) y se obtuvo un resultado similar a la cuantificación obtenida en el array.

A continuación, evaluamos los niveles de IL-17 ocasionados por la alteración de la expresión de Nr2f6 (Figura 56B). Se observó que el silenciamiento de Nr2f6 en las 3T3-L1 Snail1, aumentó ligeramente la expresión de IL-17. El efecto más claro se produjo tras la sobreexpresión de Nr2f6, que reprimió los niveles de IL-17. De esta manera, confirmamos que en las 3T3-L1 se produce un control por Nr2f6 de los niveles de IL-17, al igual que ocurre en las células Th17 (228).

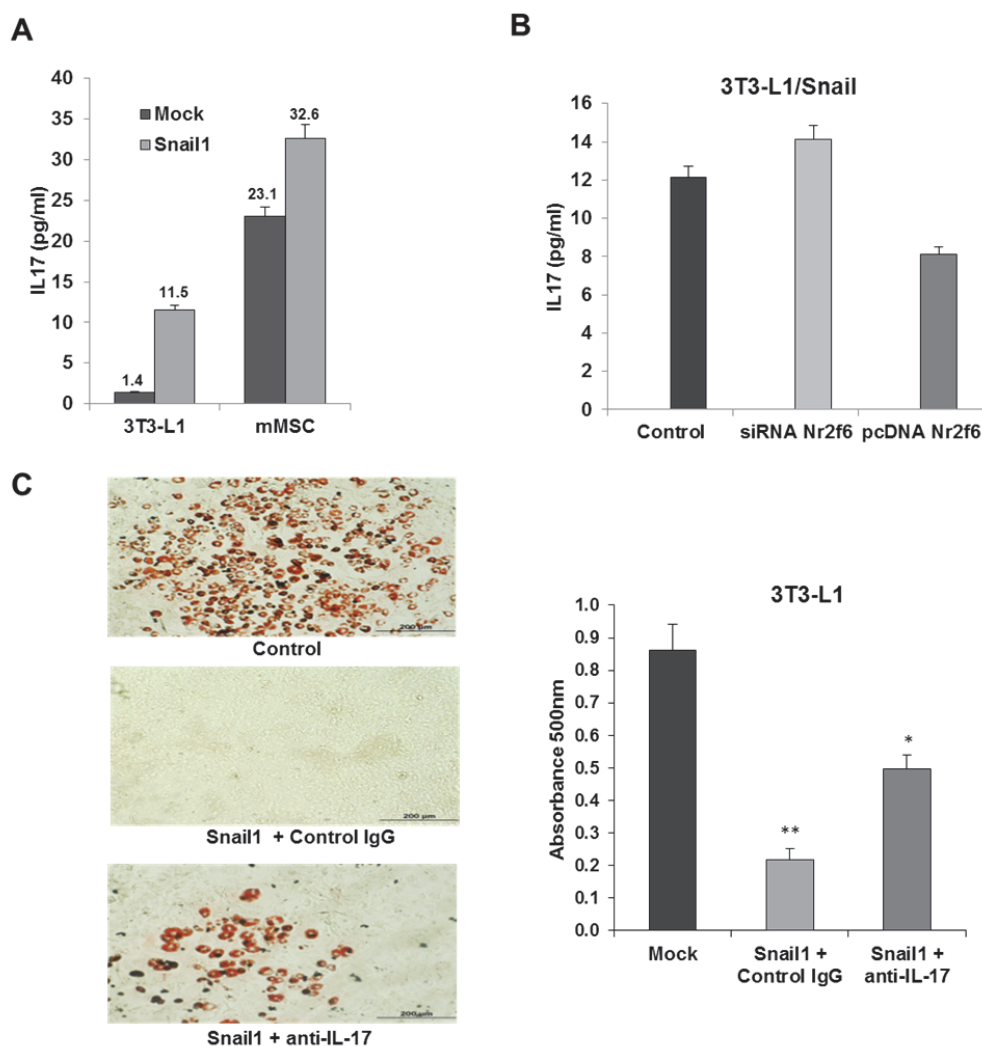
Finalmente determinamos el efecto de IL-17 sobre la adipogénesis en 3T3-L1. Para ello, realizamos un bloqueo con un anticuerpo de IL-17 de las células 3T3-L1 en cultivo que expresan Snail1 y son incapaces de diferenciarse (Figura 56C). Tras el tratamiento con el anticuerpo se recuperó un 40% de su capacidad adipogénica.





**Figura 55. Expresión de los niveles de IL-17 en las células 3T3-L1 y mMSC Snail1 y control. La expresión se evaluó mediante un microarray de citoquinas. A) Imagen de los arrays tras su incubación con el medio condicionado de las células. En el gráfico de barras se representa la expresión de IL-17 y TNF $\alpha$  en unidades arbitrarias. Se observó un aumento significativo en los medios de las células que expresan Snail. B) Datos para de las citoquinas con cambios más interesantes, obtenidos mediante el software Ludesi en 3T3-L1 y mMSC.**

Como presentamos en el trabajo publicado en MCP (230), estos resultados demuestran la capacidad de las células mesenquimales para secretar IL-17 a través de la expresión de Snail1. La sobreexpresión de Snail1 reprime la expresión de Nr2f6, lo que conlleva un incremento de la expresión de IL-17. IL-17 aumenta los niveles de C/EBP $\beta$  y reprime los niveles de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Además, Snail1 reprime Trip4, otro candidato a mediar en la diferenciación adipocítica, que también interactúa con PPAR $\gamma$ . Hemos identificado, por tanto, nuevos y relevantes mediadores en la acción de Snail1 y el mantenimiento del estado indiferenciado en células madre mesenquimales.



**Figura 56 La expresión de IL17 se controla por la inhibición de Nr2f6 por Snail1.** A) Cuantificación de los niveles de IL-17 en el medio condicionado de las células 3T3-L1 y mMSC control y Snail1 para evaluar cambios en los niveles de IL-17. B) Cuantificación por ELISA de los niveles de IL-17 en medio condicionado de las células tras el silenciamiento y la sobreexpresión de Nr2f6. C) Ensayos de diferenciación adipocítica en presencia del anticuerpo anti-IL17A (500 ng/ml). Las células diferenciadas a 15 días se tiñeron con Oil Red y se cuantificaron mediante DO a 500nm. Los datos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos llevados a cabo por duplicado. \*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . El anticuerpo anti-IL17A revertió en un 40% los efectos de la sobreexpresión de Snail1 en la diferenciación adipocítica.



## **DISCUSIÓN**



Se han desarrollado dos apartados claramente diferenciados, aunque relacionados entre sí por el estudio del cáncer y la transición epitelio-mesénquima. En esta Tesis Doctoral se han estudiado nuevas vías de señalización que participan en el desarrollo tumoral del CCR desde distintas aproximaciones experimentales. En la primera parte, hemos estudiado el papel de los AATs identificados por nuestro grupo en la progresión del CCR. En la segunda parte, hemos utilizado técnicas de proteómica cuantitativa para el estudio de las alteraciones producidas por la sobreexpresión de Snail1 en fibroblastos y su impacto sobre la diferenciación y la adipogénesis.

La caracterización de nuevos biomarcadores que permitan detectar la enfermedad en estadios tempranos mediante cribados poblacionales, así como el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para una quimioterapia más efectiva, constituyen pasos esenciales para el control de esta enfermedad en los últimos años. Nuestro laboratorio ha estudiado la respuesta humoral en CCR (72, 73). La firma de autoanticuerpos identificada para el diagnóstico del CCR, puede ser trasladada a la clínica y permitir el desarrollo de un método no invasivo de diagnóstico precoz. La respuesta humoral identificada permitió la diagnosis temprana de la enfermedad mediante la detección de estos autoanticuerpos presentes en el suero (231, 232). En nuestro laboratorio usando un modelo murino de CCR hemos observado que es capaz de mimetizar la respuesta humoral producida en los pacientes de CCR (233). Este modelo, que desarrolla la patología en el colon distal tras tratamiento con azoximetano y sulfato sódico de dextrano (AOM/DSS), nos permitió demostrar que la inducción de los autoanticuerpos se produce en estadios previos a la aparición de las lesiones cancerosas. En humanos se ha publicado la detección de anticuerpos frente a p53, c-Myc y MUC1 en mujeres sometidas a cribado de cáncer de mama 27 meses antes del diagnóstico (234), o la presencia de anticuerpos contra Ciclina B1 en pacientes con lesiones premalignas de cáncer de pulmón (66).

## **25. Caracterización de autoantígenos en cáncer colorrectal**

Los mecanismos moleculares que provocan esta respuesta humoral autoinmune en cáncer se encuentran todavía sin esclarecer. La teoría más extendida es que las proteínas asociadas a tumor pueden sufrir mutaciones puntuales, deleciones en su secuencia, encontrarse sobreexpresadas o degradarse de manera aberrante durante la progresión tumoral (235-240). La producción de autoanticuerpos puede requerir la presencia de alteraciones en las

proteínas que den lugar a neo-antígenos, para que se produzca la activación de los linfocitos B (241, 242).

Los niveles de expresión de los AATs se han descrito en estudios previos como el principal inductor de la respuesta inmune. En cáncer de tiroides se detectó una mayor frecuencia de anticuerpos contra NY-ESO-1 en pacientes que sobreexpresan la proteína (243). Datos similares se encontraron en cáncer de mama, donde el 82% de los pacientes con una expresión alta de HER2/neu tenían autoanticuerpos frente a este antígeno (244). En el modelo murino de AOM/DSS se describió la presencia de autoanticuerpos frente a p53, MAPKAPK3 o EDIL3 y su correlación con su sobreexpresión (233). Aunque la sobreexpresión es un factor importante para la aparición de la respuesta inmune, las alteraciones genéticas también pueden jugar un papel determinante. En este sentido, se ha descrito la presencia de anticuerpos frente a p53 asociados a la sobreexpresión de la proteína pero también a las mutaciones que inducen su acumulación en la célula (245). En el trabajo de Engelhorn et al. (246), indujeron autoinmunidad en ratones mediante su inmunización con librerías de DNA que presentaban mutaciones al azar en 2 fosfatasa, concluyendo que la presencia de mutaciones es suficiente para que se produzcan neo-antígenos que producen una respuesta inmune contra epítomos normales silenciosos. En cáncer, existen varios estudios donde describen respuestas inmunes contra neo-antígenos expresados por diferentes tipos de células tumorales (247, 248).

La mayoría de los AATs identificados son quinasas que son moléculas particularmente relevantes en terapia anti-tumoral. Además, en algunos de los AATs como ACVR2B (249) o SRC (250) descritos por nuestro grupo presentan una alta cantidad de mutaciones en diversos tipos tumorales. Así, por ejemplo, para SRC se ha descrito en un 1% de pacientes con CCR la mutación en el amino ácido 531 que produce un truncamiento de la proteína. Esta mutación es determinante en la progresión tumoral (251, 252). La bibliografía existente en el momento que se inició esta Tesis Doctoral sobre los niveles de expresión o las alteraciones genéticas de FGFR4 y PIM1 en CCR era muy escasa. Tampoco se conocía el papel que podrían jugar estas dos proteínas en el desarrollo del proceso tumoral. Por ello, nos hemos centrado en el estudio de estos 2 AATs, con el fin de identificar sus posibles alteraciones a nivel genético y proteico, que puedan ser responsables de la inducción de la respuesta humoral y estudiar su papel en el desarrollo tumoral.

En este trabajo se ha observado una sobreexpresión de FGFR4 en CCR, lo que confirma una correlación entre su nivel de expresión y la presencia de autoanticuerpos. A nivel genético se han descrito un buen número de mutaciones somáticas oncogénicas para FGFR2 y FGFR3 (253). En FGFR4 solo se ha descrito el polimorfismo Gly388Arg, que se asocia a peor pronóstico y mayor agresividad en diversos tipos de cáncer (209, 254, 255). Nuestro análisis genético de FGFR4 demostró la presencia del polimorfismo Gly388Arg en células KM12 y SW48, y en un 60% de los pacientes de CCR. Además, se encontraron dos SNP en líneas tumorales y pacientes de CCR, pero ninguno de ellos con capacidad para alterar la actividad del receptor FGFR4. Estos datos sugieren la sobreexpresión de FGFR4 como relevante para la progresión del cáncer colorrectal. Heinzle et al. (256) describieron que la sobreexpresión de FGFR4 era necesaria para que el polimorfismo Gly388Arg tenga relevancia en el desarrollo tumoral. Por esta razón, hemos caracterizado el papel de la sobreexpresión de FGFR4 en la progresión del cáncer colorrectal. El silenciamiento de FGFR4 produjo una disminución significativa en proliferación, adhesión, migración e invasión en células tumorales. Por primera vez se describe los efectos pro-metastásicos de las células con expresión de FGFR4 y su asociación con los niveles de mediadores de EMT como Snail1 o TWIST. El silenciamiento de FGFR4 produjo la disminución de los niveles de TWIST y el aumento de E-cadherina. Estudios previos describen la expresión de FGFR1 y 2 asociado a la metástasis en cáncer de próstata y su posible relación con procesos de transición epitelio-mesénquima (129, 257). Sin embargo, la relación de FGFR4 con la EMT en cáncer no se había descrito hasta el presente trabajo, siendo un proceso fundamental para el control de la invasión tumoral en CCR. Esta relación con mediadores de la EMT como Snail1 o Twist también puede aportar datos sobre la participación de FGFR4 en los procesos donde participa en morfogénesis en el desarrollo embrionario. En conjunto, nuestros resultados nos indican que el silenciamiento de FGFR4 provoca una reversión del fenotipo mesenquimal hacia uno más epitelial, con una disminución significativa de las propiedades tumorigénicas de las células de CCR. Hemos caracterizado la señalización llevada a cabo por FGFR4 en CCR para controlar las distintas propiedades tumorigénicas a través de las vías activadas por SRC y ERK1/2 (implicadas principalmente en la proliferación celular e invasión) y AKT (en la supervivencia) (126), aspectos fundamentales en metástasis.

La utilización de miembros de la familia FGFR como dianas terapéuticas en cáncer colorrectal se ha estudiado previamente en algunos tipos tumorales (181, 258, 259). En receptores FGFR3 se han realizado algunos estudios capaces inhibir la proliferación celular en



líneas celulares de cáncer de próstata mediante el uso de librerías de scFvs o inhibidores químicos frente a este receptor. Pero en el caso de FGFR3 lo que presentan los pacientes son mutaciones activadores que llevan a una dimerización del receptor y su sobreactivación siendo su abordaje terapéutico diferente al que hemos realizado nosotros. A pesar de la existencia de estos estudios previos, nunca se había valorado la capacidad de FGFR4 como diana terapéutica en CCR. Para ello, evaluamos dos inhibidores multiquinasa y anticuerpos específicos en distintas líneas de CCR. El inhibidor Dovitinib fue el más eficaz para inhibir la proliferación tumoral, probablemente debido a su mayor espectro de acción en la inhibición de varias familias de quinasas. Se observó que las células KM12 con el polimorfismo Gly388Arg eran más sensibles a Dovitinib, presentando una gran oportunidad para el desarrollo de una terapia personalizada en aquellos pacientes de CCR con este polimorfismo. El uso de anticuerpos específicos para FGFR4 produjo una disminución en la proliferación celular, confirmando el valor de FGFR4 como diana terapéutica. En este mismo sentido, recientemente se ha descrito que el bloqueo de FGFR4 con un anticuerpo monoclonal específico era capaz de impedir el crecimiento de hepatocarcinomas en un modelo murino (260). El valor de FGFR4 como diana se confirmó porque los tumores generados por las células silenciadas *in vivo* eran más pequeños y presentaban una supresión de la vascularización en el tumor. Sugiriendo la participación de FGFR4 en procesos de angiogénesis. En el futuro, la utilización de anticuerpos más eficaces para el bloqueo de FGFR4 pueden permitir tratamientos en modelos *in vivo* de manera que podamos reducir el tamaño y la vascularización de tumores con altos niveles de expresión de FGFR4.

Hemos identificado nuevos mediadores en la señalización por FGFR4 que nos permitieran explicar su implicación en angiogénesis y otros procesos como su papel en supervivencia. Entre las proteínas identificadas, una de las más interesantes fue MCTS1, que es un oncogén implicado en la regulación del ciclo celular, mecanismos de reparación del DNA y, especialmente, en la angiogénesis. La sobreexpresión de MCTS1 en cáncer de mama aumentó las capacidades tumorigénicas y la vasculatura en los tumores generados *in vivo* (261, 262). Por tanto, la interacción de MCTS1 con FGFR4 puede estar relacionada con la ausencia de vascularización observada en los ensayos *in vivo*. También se encontraron proteínas como RSU1 o RALA que participan directamente en la vía de señalización de RAS-MAPK (263), cuya interacción con la familia FGFR no se había descrito previamente, y proteínas como BAP31 o S100A14, que participan en el control del ciclo celular y la apoptosis.

BAP31 es una proteína que se localiza en el retículo endoplásmico y en la membrana celular, y cuyo dominio citoplasmático presenta dos sitios de corte para caspasas. Cuando se produce el corte en esa región, se genera el fragmento p20 que permanece integrado en la membrana y produce estrés del retículo endoplásmico, siendo un potente inductor de la muerte celular (264-266). FGFR4 podría participar en la estabilización de BAP31 evitando el corte por caspasas y dotando de resistencia a las células tumorales frente a este mecanismo de apoptosis. S100A14 interacciona con p53 y produce la activación de la metaloproteínasa MMP-2, participando en el control de la apoptosis, el incremento de la invasividad y la motilidad celular en las células que sobreexpresan S100A14 (267). Además, hemos identificado otras proteínas interesantes como componentes de la activación del complejo RISC, reguladores de la fosfatasa PP2A o proteínas que participan en vías de señalización de citoquinas.

En resumen, hemos demostrado el potencial oncogénico de FGFR4 en cáncer colorrectal, vinculando los efectos producidos en la invasión y la migración con la regulación de los mediadores de EMT, principalmente TWIST. También, hemos demostrado las posibilidades de FGFR4 como diana terapéutica en CCR y su papel clave en los procesos de vascularización tumoral *in vivo*. Por último, hemos descrito posibles mediadores de FGFR4 en nuevos procesos celulares, como la regulación del ciclo celular, la apoptosis o la angiogénesis. Estas interacciones deberán ser confirmadas en futuros experimentos.

Los meta-análisis realizados mostraron un aumento moderado de la expresión de PIM1 en carcinoma colorrectal. En estudios previos se ha descrito la sobreexpresión de PIM1 en CCR en torno al 12%, pero sin indicar el estadio de los pacientes utilizados en las inmunohistoquímicas (268, 269). Nuestro análisis demostró una baja expresión de PIM1 en estadios tempranos de CCR, que aumentaba en pacientes con estadios más avanzados. Por tanto, la presencia de autoanticuerpos para PIM1 en estadios tempranos no se podría atribuirse a los niveles de expresión de la proteína sino mas bien a otras alteraciones. Se han descrito procesos de hipermutación somática en linfoma difuso de células B grandes para PIM1, donde el análisis de 111 casos de linfoma permitió identificar más de 60 alteraciones genéticas en la región 5' UTR de PIM1 y en su secuencia codificante (270). En CCR, los estudios de secuenciación masiva realizados por el consorcio TCGA solo encontraron 3 mutaciones somáticas para PIM1 tras el análisis de 224 muestras (271). En contraste, nuestro análisis genético por secuenciación directa de los productos de PCR, nos ha permitido identificar 7

mutaciones somáticas en 40 pacientes de CCR. Esta discrepancia se puede deber a que los algoritmos informáticos diseñados para la identificación de mutaciones en la secuenciación masiva, consideren como falsos positivos las mutaciones con un bajo número de lecturas descartándolas. En nuestro caso, el uso de polimerasas *proof-reading* de alta calidad, la comparación con el tejido normal adyacente y el uso de pacientes que muestran una respuesta inmune frente a PIM1, confiere seguridad al análisis realizado. La gran cantidad de alteraciones somáticas encontradas para PIM1, podrían ser causadas por alteraciones en los genes de reparación de DNA (MMR), producidas por la inestabilidad de microsatélites o por el fenotipo metilador en CCR. Las alteraciones en el sistema MMR son la principal causa para que se produzcan hipermutaciones en linfomas difusos, como ya se ha mencionado (270). El alto número de mutaciones en PIM1 observadas en CCR podrían producir cambios estructurales o de localización subcelular en las proteínas mutantes, y ser responsables de producir la respuesta humoral que presentan los pacientes con CCR.

Previamente se ha descrito que la supresión de la expresión de PIM1 produce una pérdida de la capacidad tumorigénica en líneas tumorales de CCR (272). Nosotros hemos observado que la sobreexpresión de PIM1 no produjo cambios significativos en la proliferación celular, aunque aumentó la adhesión e invasión de células KM12L4 metastásica, hacia hígado y pulmón. Por otro lado, que PIM1 es capaz de aumentar la resistencia a apoptosis mediante un aumento en los niveles de Bcl-XL y la disminución de caspasa 3. El aumento de la proliferación producido por PIM1 se podría deber a la activación de las vías de señalización controladas por c-Myc, mTOR y p27, como se ha descrito previamente en cáncer de próstata (58, 273). Por análisis genético de 40 pacientes de CCR identificamos 7 mutaciones somáticas y la presencia del polimorfismo His48Asp en un 20%. La mutación Ala315Thr y el polimorfismo His48Asp produjeron un aumento significativo en los niveles de proliferación, invasividad y supervivencia de las células que expresan estas variantes de PIM1. Los resultados *in vivo* confirmaron estos datos. De hecho, en ratones atímicos, los tumores generados a partir de células transfectadas con las variantes mostraron mayor tamaño que los tumores generados con la proteína wild type. Observamos que la activación de BCLs, c-Myc y mTOR fue mayor por las variantes de PIM1, lo que puede ser debido a una mayor actividad quinasa, una mayor estabilidad de los mutantes o una mayor resistencia a la degradación por el proteasoma.

Para intentar explicar el aumento de la actividad de PIM1 por la mutación Ala315Thr hemos estudiado *in silico* la posible alteración en su estructura. Esta alteración produce un potencial aumento de la flexibilidad de la proteína dentro de los límites de estabilidad. El aumento de la flexibilidad está relacionado con una mayor actividad catalítica, y podría explicar la mayor actividad de esta variante en nuestros ensayos. Dado que la mutación His48Asp no se encuentra en la región cristalizada no hemos podido evaluar su impacto en la estructura. El análisis de supervivencia a diez años no mostró datos significativos asociados a la presencia de este polimorfismo, por lo que no es útil como marcador pronóstico en pacientes de CCR. Sería interesante el análisis como marcador de pronóstico en CCR de la mutación Ala315Thr, ya que presenta una alta frecuencia (10%) en los pacientes.

Respecto al resto de alteraciones descritas, el mutante de delección  $\Delta 303$  provocó una reducción no significativa en los niveles de proliferación *in vitro* de las células KM12. Convendría extenderse a otras líneas celulares, ya que estudios previos demostraron que la región C-terminal es responsable de su translocación al núcleo, aumentando los niveles de PIM1 en el núcleo de células endoteliales de ratón y la proliferación celular (274). En futuros trabajos se podrán evaluar el resto de las alteraciones y determinar su papel en el desarrollo tumoral. Además, podríamos cuantificar la actividad de las proteínas mutantes mediante inmunoensayos capaces de detectar las isoformas fosforiladas de proteínas reguladas por PIM1 como Bad o p21<sup>WAF1</sup>.

Como conclusión de este bloque de la Tesis Doctoral hemos demostrado que la identificación de AATs (275) nos ha permitido demostrar el impacto de los AATs en el desarrollo tumoral de CCR, la presencia de diferentes mecanismos de inducción de anticuerpos y el valor de FGFR4 como nueva diana terapéutica en cáncer de colon (214).

## **26. Papel de Snail1 en la diferenciación de fibroblastos y adipogénesis**

En los últimos años el estudio del microambiente tumoral ha posibilitado una mejor comprensión del desarrollo tumoral, permitiendo la identificación de nuevos biomarcadores y desarrollo de nuevas dianas terapéuticas (276). El principal componente del estroma tumoral son los fibroblastos asociados a cáncer, células clave en la regulación de procesos como el crecimiento del tumor primario o la capacidad metastásica del mismo (277, 278). La activación

de los fibroblastos en el estroma tumoral se produce principalmente por TGF $\beta$  (279). TGF $\beta$  es una molécula clave en la iniciación de la EMT en diversos tipos tumorales (280). En fibroblastos promueve la expresión de Snail1, produciendo un loop de auto-activación debido a la inducción de la transcripción de TGF $\beta$  por Snail1. Por otro lado, Snail1 aumenta la expresión de distintos marcadores de fibroblastos activos como S100A4 o  $\alpha$ SMA (281, 282). El análisis de la expresión de Snail1 en distintos tumores sólidos muestra su localización, principalmente, en los fibroblastos situados en el frente de avance del tumor (130). Además, Snail1 regula funciones clave para la homeostasis de las células mesenquimales, como los procesos de diferenciación y proliferación de una forma aun no clarificada (283, 284).

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral hemos estudiado los mecanismos moleculares relacionados con la inhibición por Snail1 de la adipogénesis en células mesenquimales. Al empezar este trabajo existía cierta controversia sobre los mecanismos de control de Snail1 sobre la diferenciación (136, 138). Batlle et al. describieron cómo el tratamiento con TGF $\beta$  indujo la expresión de Snail1 en las células 3T3-L1 y mMSC, produciendo la represión de PTEN por unión directa a su promotor lo que da lugar a una activación de AKT. Esta activación producía la expresión de marcadores de fibroblastos activos como S100A4 o CD44, que junto a la activación de la transcripción de TGF $\beta$  mantiene a los fibroblastos en un estado indiferenciado. Por otro lado Lee et al. describieron el control de Snail1 sobre la diferenciación adipocítica a través de la represión de PPAR $\gamma$  por su unión a las cajas E de su promotor, además Snail1 producía la activación de la vía de señalización Wnt-GSK3 $\beta$  en las células 3T3-L1 inhibiendo su diferenciación. Para intentar clarificar este proceso, decidimos aplicar la proteómica al estudio de las alteraciones inducidas por Snail1 durante el proceso de diferenciación adipocítica.

Mediante el análisis proteómico cuantitativo de las líneas 3T3-L1 y mMSC con y sin sobreexpresión de Snail1, identificamos un gran número de factores de transcripción, citoquinas y factores de crecimiento desregulados por Snail1, que nos permiten entender cómo estas células detienen su diferenciación hacia otros tipos celulares y aumentan sus niveles de proliferación. Hemos demostrado que Snail regula la diferenciación adipocítica a través de la inhibición de la expresión del receptor nuclear huérfano Nr2f6, el cual regula negativamente la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-17 (229). Por tanto, la represión de Nr2f6 favorece la síntesis de IL-17 que sería el responsable de inhibir la adipogénesis.

Se observó un aumento en los niveles de C/EBP $\beta$  asociado a las fases tempranas de la adipogénesis (285, 286). Se sabe que IL-17 inhibe la diferenciación de 3T3-L1 a través del control de los niveles de expresión de C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y los “factores Kruppel” (287, 288). IL-17 inhibe la adipogénesis sin afectar la expresión de c/EBP $\beta$  y c/EBP $\delta$ , y antes de que se produzca la expresión de c/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (288). Sin embargo, estos estudios previos no indicaban cómo una citoquina característica de linfocitos Th17 estaba presente en células mesenquimales.

IL-17 es una citoquina proinflamatoria, capaz de controlar la masa ósea (137), inhibir la formación de osteoclastos (289) y/o la diferenciación a condrocitos (290). A la vista de los resultados obtenidos, sugieren que la inhibición de la diferenciación a osteoblastos asociados con la expresión de Snail (136) estarían también causados por IL-17. La capacidad de los fibroblastos activos para producir IL-17 abre nuevas posibilidades de acción que va más allá de la expresión por los linfocitos Th17. Además, esta capacidad de Snail para regular la expresión de IL-17, sugiere un nuevo papel de esta molécula en distintas patologías como la obesidad, la artritis reumatoide o la osteoporosis. Dado que Snail1 y TGF $\beta$  forman un loop de auto-estimulación, Snail o TGF $\beta$  podrían ser dianas interesantes en estas patologías.

Nuestros resultados para Nr2f6 son similares a los descritos previamente para Nr2f2 (también conocido como COUP-TFII) en adipogénesis (291). Estos datos podrían sugerir una interacción cooperativa entre ambos receptores nucleares huérfanos. Sin embargo, el papel de Nr2f2 en adipogénesis es contradictorio, ya que un artículo por Xu et al. (292) establece que Nr2f2 inhibe la diferenciación. Nuestros datos muestran una disminución no significativa de los niveles de Nr2f2 en 3T3-L1 (0.934). Según la base de datos Nrf2ome (293), Nr2f6 puede interaccionar y regular un gran número de receptores nucleares, entre ellos Nr2f2, Esr1 (receptor de estrógeno) o Angptl1. Aunque Nr2f6 se encuentra menos caracterizado que Nr2f2, ambos receptores presentan funciones muy relacionadas. Sin embargo, mientras el ratón “Knock-out” (KO) de Nr2f2 es letal, el ratón KO para Nr2f6 es viable, aunque presenta desórdenes neurológicos (294). Nr2f2 puede suponer un nexo de unión entre Nr2f6, Trip4 y otros factores de transcripción (295, 296). Por otro lado, ESR1 interactúa con Nr2f6, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , RARA, STAT3, STAT5, Trip4 o Sra1, entre muchos otros factores de transcripción (297), estas interacciones entre estos factores de transcripción pueden ser claves para

entender los efectos producidos por Snail1. De hecho, muchos de estos receptores nucleares participan en la expresión de IL-17, como VDR, RARA, ER o LXR (229). Por tanto, sería necesario clarificar la relación entre todos estos factores y receptores nucleares para dilucidar totalmente el papel de Snail.

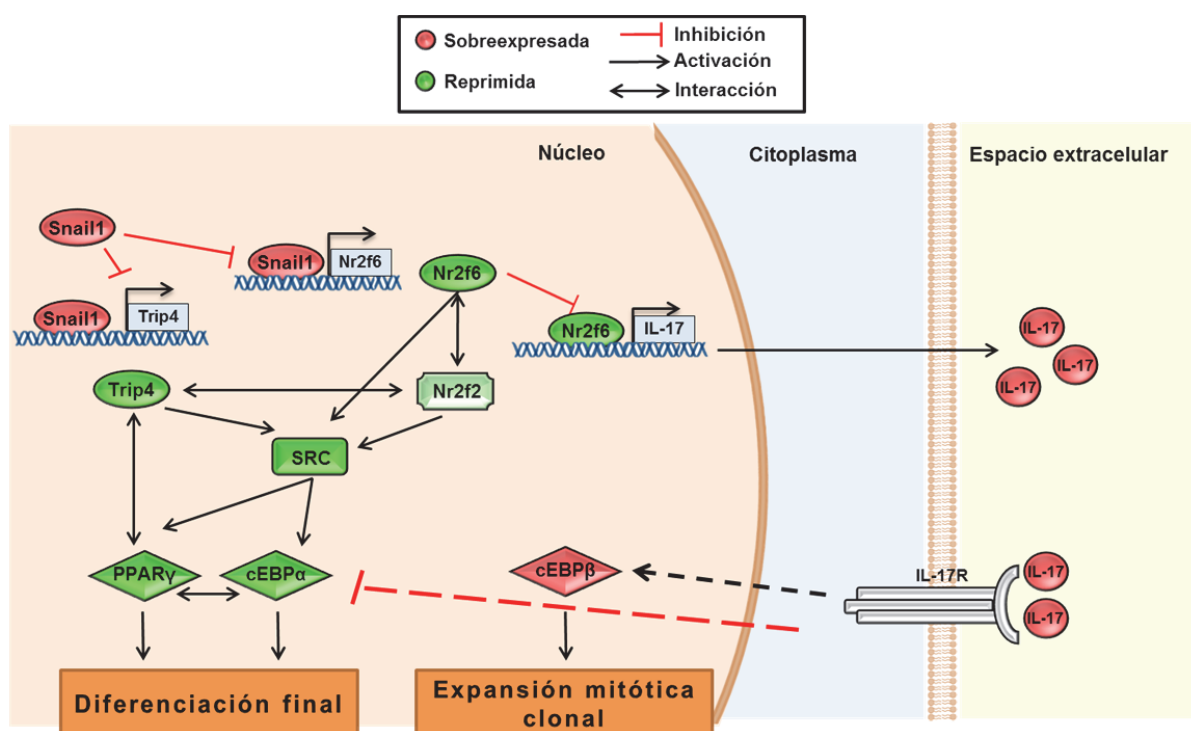
También se observó un incremento en diferentes proteínas del complejo NuRD en las células mesenquimales debido a la expresión de Snail. Este complejo funciona como un factor de transcripción y participa en procesos de remodelación de la cromatina, teniendo un papel clave en la transcripción, el ciclo celular o la estabilidad genómica (223). NuRD puede actuar como un activador o un represor transcripcional, según los diferentes componentes que formen el complejo y las modificaciones post-traduccionales que presenten. La actividad del complejo NuRD controla los niveles de acetilación de las histonas, lo que produce cambios en los niveles de apertura de la cromatina permitiendo o no la expresión génica.

El complejo NuRD está formado por siete subunidades: histonas deacetilasas (HDAC1 y HDAC2) que forman el núcleo catalítico, proteínas de unión a histona (Rbbp4 y Rbbp7), proteínas asociadas a metástasis (MTA1, MTA2 o MTA3), proteínas de unión a dominios CpG metilados (MBD2 o MBD3) y proteínas de unión al cromodominio de la DNA helicasa (CHD3 o CHD4). En las células 3T3-L1/Snail1 observamos un aumento de prácticamente todos los componentes de NuRD. En MSCs observamos que este aumento se restringió a MTA1, CHD4 y Rbbp7. Por lo tanto, MTA1 y CHD4 junto a la sobreexpresión de MBD2 identificada en proteómica indican que Snail1 participa en el aumento del subcomplejo NuRD conocido como MeCP1. El conocimiento de las interacciones entre Snail y el complejo MeCP1 no solo en fibroblastos sino en otros tipos celulares. De esta manera se podría establecer un nuevo papel de control a nivel epigenético de remodelación de la cromatina de Snail1, pudiendo ser clave para la expresión o represión de múltiples factores de transcripción que participen en procesos de diferenciación, proliferación celular o EMT.

Otro factor de transcripción regulado por Snail1 que demostró un pequeño efecto sobre la adipogénesis, fue Trip4. Trip4, también conocido como Asc1 (cointegrador de señales activadoras 1), es un coactivador transcripcional de receptores nucleares que juega un papel central en la transactivación de NFκB y AP1 (298). Trip4 también regula la activación del receptor de andrógenos y la función testicular (299, 300), y se ha descrito su interacción con



PPAR $\gamma$  (301). Adicionalmente, identificamos Prrx1 como diana de Snail1. Prrx1 es otro inductor de la transición epitelio-mesénquima y produce una reversión de la EMT en células tumorales epiteliales, aparentemente sin participación de Snail1 (302). Nosotros hemos observado una represión directa de Prrx1 por Snail en preadipocitos 3T3-L1 y mMSC, confirmada mediante ensayos de luciferasa y ChIP. Sin embargo, el silenciamiento de Prrx1 no afectó a la diferenciación adipogénica. Otra proteína reprimida fue Sra1 (activador RNA del receptor esteroide), que promueve la diferenciación adipocítica mediante la expresión de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , incrementando los niveles de glucosa en la célula y la fosforilación de proteínas como Akt o Foxo1 en respuesta a insulina (303). La represión de Sra1 puede contribuir a la supresión de PPAR $\gamma$  y la inhibición de la adipogénesis.



**Figura 57. Modelo de la acción de Snail1 en la diferenciación adipocítica.** Las células mesenquimales son capaces de secretar IL-17 e inhibir la diferenciación adipocítica a través de la expresión de Snail1 y la represión que produce sobre la expresión del receptor nuclear Nr2f6. Además, se ha descrito la interacción de otros factores de transcripción como Trip4 y Nr2f2 que pueden interaccionar con los factores de transcripción que dirigen la diferenciación adipocítica. Nr2f2 representa un nodo central entre Nr2f6 y Trip4. Estas últimas interacciones requieren de una investigación más profunda.

A la luz de nuestros resultados y dada la capacidad demostrada por Snail1 para unirse a múltiples promotores, resulta improbable que la inhibición directa de Snail sobre PPAR $\gamma$



descrita por Lee et al (138) sea funcionalmente relevante o más bien una represión inespecífica. Nuestros resultados demuestran que el efecto de Snail1 en la adipogénesis tiene lugar a través del control que ejerce sobre Nr2f6 e IL-17, y antes de que se produzca la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Figura 57). Muchos de los factores de transcripción regulados por Snail (Nr2f6, Trip4 o Sra1) son capaces de interactuar entre sí, y directa o indirectamente con PPAR $\gamma$ . Sin embargo, la represión de Nr2f6 fue la única que afectó a la diferenciación adipocítica a través de la señalización producida por IL-17. Por tanto, IL-17 es el mediador crítico inducido por Snail1 para inhibir la diferenciación. Los resultados demostraron un nexo entre la expresión de Snail1, inflamación y adipogénesis. Snail1 participa en el control de la expresión o represión de múltiples factores de transcripción que a su vez controlan la expresión de genes que participan en la diferenciación celular a diferentes niveles. Estos resultados demuestran un nuevo papel para Snail que va más allá de laplasticidad epitelial.

## **CONCLUSIONES**



1. FGFR4 se sobreexpresa en tejido tumoral de CCR, pero no presenta mutaciones somáticas. Su sobreexpresión es responsable de la inducción de autoanticuerpos en pacientes de CCR.
2. FGFR4 actúa como regulador de la invasión en cáncer colorrectal y participa en la transición epitelio mesénquima. El silenciamiento de FGFR4 produce una disminución de los marcadores mesenquimales (TWIST1 o SNAIL) y aumento en la expresión de marcadores epiteliales, principalmente E-cadherina.
3. Se ha demostrado la capacidad de Dovitinib y anticuerpos específicos de FGFR4 para bloquear la proliferación del CCR, lo que sugiere un valor de FGFR4 como diana terapéutica.
4. Se han observado un alto número de mutaciones en PIM1 que sugieren un efecto en la inducción de autoanticuerpos en pacientes de CCR.
5. La mutación somática Ala315Thr en PIM1 presenta una alta frecuencia en pacientes de CCR (10%). Esta mutación produce un aumento de la proliferación y la invasión tumoral. El análisis *in silico* de la estructura 3D muestra que puede ser debido a la adquisición de una mayor flexibilidad del centro activo de la enzima que proporciona una mayor actividad quinasa de PIM1.
6. En conclusión, la respuesta humoral que se produce en CCR y otros tumores nos aporta información sobre la presencia de alteraciones a nivel de expresión o genéticas de los AATs principalmente quinasas que pueden ser claves para el desarrollo tumoral de CCR.

7. Mediante proteómica cuantitativa, hemos descrito que Snail1 altera la expresión de múltiples proteínas. Snail reprimió la expresión de los factores de transcripción Prrx1, Trip4, OsmR, Nr2f6, y Cbx6, mediante la unión directa a sus promotores. En contraposición, provocó el aumento del complejo NuRD y otros factores que participan en la remodelación de la cromatina Hmga2 y Top2a.
8. Snail1 detiene la adipogénesis en una fase de diferenciación intermedia. Posterior al aumento de C/EBP $\beta$ , relacionado con el aumento de la división celular, y anterior a la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , responsables de la expresión de genes específicos de adipocitos.
9. El receptor nuclear huerfano Nr2f6 es clave en el control de la adipogénesis. La represión de Nr2f6 por Snail produce un aumento en la expresión de IL-17. La sobreexpresión de Nr2f6 produce una aceleración de la diferenciación adipocítica por una activación de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\alpha$ , además su sobreexpresión produce una disminución en los niveles de proliferación celular.
10. Snail1 promueve la expresión de IL-17 para reprimir la adipogénesis. El bloqueo de IL-17 mediante un anticuerpo promueve la diferenciación adipocítica y revierte los efectos de Snail. Por primera vez se ha descrito una conexión entre Snail e IL-17, citoquina clave en diferenciación celular, inflamación, autoinmunidad y resistencia a quimioterapia.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917. Epub 2011/02/26.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. Epub 2014/09/16.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
5. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 2003;361(9368):1496-501. Epub 2003/05/10.
6. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2029-43 e10. Epub 2010/04/28.
7. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *Jama*. 2008;300(23):2765-78. Epub 2008/12/18.
8. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):388-95. Epub 2008/02/05.
9. Buchanan DD, Sweet K, Drini M, Jenkins MA, Win AK, English DR, et al. Risk factors for colorectal cancer in patients with multiple serrated polyps: a cross-sectional case series from genetics clinics. *PLoS One*. 2010;5(7):e11636. Epub 2010/07/28.
10. Ponz de Leon M, Benatti P, Borghi F, Pedroni M, Scarselli A, Di Gregorio C, et al. Aetiology of colorectal cancer and relevance of monogenic inheritance. *Gut*. 2004;53(1):115-22. Epub 2003/12/20.
11. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1996;334(2):82-7. Epub 1996/01/11.
12. Cottet V, Pariente A, Nalet B, Lafon J, Milan C, Olschwang S, et al. Colonoscopic screening of first-degree relatives of patients with large adenomas: increased risk of colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1086-92. Epub 2007/10/09.
13. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(3):739-50. Epub 2009/02/26.
14. Burt RW, Barthel JS, Dunn KB, David DS, Drelichman E, Ford JM, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2010;8(1):8-61. Epub 2010/01/13.
15. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(4):261-8. Epub 2004/02/19.
16. Lynch PM, Wargovich MJ, Lynch HT, Palmer C, Lanspa S, Drouhard T, et al. A follow-up study of colonic epithelial proliferation as a biomarker in a Native-American family with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991;83(13):951-4. Epub 1991/07/03.
17. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Diseases of the colon and rectum*. 1991;34(5):424-5. Epub 1991/05/01.
18. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res*. 1999;59(20):5068-74. Epub 1999/10/28.
19. Woerner SM, Kloor M, Mueller A, Rueschoff J, Friedrichs N, Buettner R, et al. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene*. 2005;24(15):2525-35. Epub 2005/03/01.



20. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991;66(3):589-600. Epub 1991/08/09.
21. Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(43):5397-408. Epub 2009/11/17.
22. Calva D, Howe JR. Hamartomatous polyposis syndromes. *The Surgical clinics of North America*. 2008;88(4):779-817, vii. Epub 2008/08/02.
23. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32. Epub 1988/09/01.
24. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-9. Epub 1999/01/01.
25. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2004;23(1-2):11-27. Epub 2004/03/06.
26. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1079-99. Epub 2008/09/09.
27. Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Seminars in cancer biology*. 2005;15(1):33-42. Epub 2004/12/23.
28. Staton CA, Chetwood AS, Cameron IC, Cross SS, Brown NJ, Reed MW. The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma carcinoma sequence in colorectal cancer. *Gut*. 2007;56(10):1426-32. Epub 2007/06/15.
29. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(28):3784-91. Epub 2007/07/28.
30. Lindblom A. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Current opinion in oncology*. 2001;13(1):63-9. Epub 2001/01/10.
31. Jallepalli PV, Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):109-17. Epub 2002/03/22.
32. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812-6. Epub 1993/05/07.
33. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363(6429):558-61. Epub 1993/06/10.
34. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501. Epub 2002/07/03.
35. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, et al. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(5):563-70. Epub 2003/04/30.
36. Esteller M, Fraga MF, Paz MF, Campo E, Colomer D, Novo FJ, et al. Cancer epigenetics and methylation. *Science*. 2002;297(5588):1807-8; discussion -8. Epub 2002/09/17.
37. Ferracin M, Gafa R, Miotto E, Veronese A, Pultrone C, Sabbioni S, et al. The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *The Journal of pathology*. 2008;214(5):594-602. Epub 2008/02/05.
38. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(12):988-93. Epub 2004/12/02.
39. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*. 2002;51(6):797-802. Epub 2002/11/13.

40. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38(7):787-93. Epub 2006/06/29.
41. Thompson MR, Perera R, Senapati A, Dodds S. Predictive value of common symptom combinations in diagnosing colorectal cancer. *The British journal of surgery.* 2007;94(10):1260-5. Epub 2007/08/19.
42. Harewood GC, Ahlquist DA. Fecal occult blood testing for iron deficiency: a reappraisal. *Dig Dis.* 2000;18(2):75-82. Epub 2000/11/04.
43. Cappell MS. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. *The Medical clinics of North America.* 2005;89(1):1-42, vii. Epub 2004/11/06.
44. Dukes C. Histological Grading of Rectal Cancer: (Section of Pathology). *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1937;30(4):371-6. Epub 1937/02/01.
45. Scholefield JH. ABC of colorectal cancer: screening. *BMJ.* 2000;321(7267):1004-6. Epub 2000/10/20.
46. Thompson MR, Flashman KG, Wooldrage K, Rogers PA, Senapati A, O'Leary DP, et al. Flexible sigmoidoscopy and whole colonic imaging in the diagnosis of cancer in patients with colorectal symptoms. *The British journal of surgery.* 2008;95(9):1140-6. Epub 2008/07/16.
47. Ouyang DL, Chen JJ, Getzenberg RH, Schoen RE. Noninvasive testing for colorectal cancer: a review. *The American journal of gastroenterology.* 2005;100(6):1393-403. Epub 2005/06/03.
48. Levi Z, Birkenfeld S, Vilkin A, Bar-Chana M, Lifshitz I, Chared M, et al. A higher detection rate for colorectal cancer and advanced adenomatous polyp for screening with immunochemical fecal occult blood test than guaiac fecal occult blood test, despite lower compliance rate. A prospective, controlled, feasibility study. *Int J Cancer.* 2011;128(10):2415-24. Epub 2010/07/27.
49. Parra-Blanco A, Gimeno-Garcia AZ, Quintero E, Nicolas D, Moreno SG, Jimenez A, et al. Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac faecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *Journal of gastroenterology.* 2010;45(7):703-12. Epub 2010/02/17.
50. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanas A, et al. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2012;366(8):697-706. Epub 2012/02/24.
51. Faivre J, Dancourt V, Lejeune C, Tazi MA, Lamour J, Gerard D, et al. Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology.* 2004;126(7):1674-80. Epub 2004/06/10.
52. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer.* 2007;43(9):1348-60. Epub 2007/05/22.
53. Macdonald JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Seminars in oncology.* 1999;26(5):556-60. Epub 1999/10/21.
54. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer.* 2003;39(6):718-27. Epub 2003/03/26.
55. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(33):5313-27. Epub 2006/10/25.
56. Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome research.* 1996;6(7):639-45. Epub 1996/07/01.
57. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74. Epub 2001/09/13.

58. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001;412(6849):822-6. Epub 2001/08/24.
59. Thykjaer T, Workman C, Kruhoffer M, Demtroder K, Wolf H, Andersen LD, et al. Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer Res*. 2001;61(6):2492-9. Epub 2001/04/06.
60. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*. 1996;14(4):457-60. Epub 1996/12/01.
61. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6. Epub 2002/02/02.
62. Sadanandam A, Gray J, Hanahan D. Reply to Colorectal cancer classification based on gene expression is not associated with FOLFIRI response. *Nat Med*. 2014;20(11):1231-2. Epub 2014/11/07.
63. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homiczko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013;19(5):619-25. Epub 2013/04/16.
64. Sadanandam A, Wang X, de Sousa EMF, Gray JW, Vermeulen L, Hanahan D, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications. *Cell Cycle*. 2014;13(3):353-7. Epub 2014/01/11.
65. Ersvaer E, Zhang JY, McCormack E, Olsnes A, Anensen N, Tan EM, et al. Cyclin B1 is commonly expressed in the cytoplasm of primary human acute myelogenous leukemia cells and serves as a leukemia-associated antigen associated with autoantibody response in a subset of patients. *Eur J Haematol*. 2007;79(3):210-25. Epub 2007/07/28.
66. Suzuki H, Graziano DF, McKolanis J, Finn OJ. T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(4):1521-6. Epub 2005/03/05.
67. Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2003;99(1):113-32. Epub 2003/06/14.
68. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1745-59. Epub 2006/05/31.
69. Chen G, Wang X, Yu J, Varambally S, Thomas DG, Lin MY, et al. Autoantibody profiles reveal ubiquitin 1 as a humoral immune response target in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2007;67(7):3461-7. Epub 2007/04/06.
70. Anderson KS, Ramachandran N, Wong J, Raphael JV, Hainsworth E, Demirkan G, et al. Application of protein microarrays for multiplexed detection of antibodies to tumor antigens in breast cancer. *J Proteome Res*. 2008;7(4):1490-9. Epub 2008/03/04.
71. Nam MJ, Madoz-Gurpide J, Wang H, Lescure P, Schmalbach CE, Zhao R, et al. Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of autoantibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3. *Proteomics*. 2003;3(11):2108-15. Epub 2003/11/05.
72. Barderas R, Babel I, Diaz-Uriarte R, Moreno V, Suarez A, Bonilla F, et al. An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays. *J Proteomics*. 2012;75(15):4647-55. Epub 2012/04/03.
73. Babel I, Barderas R, Diaz Uriarte R, Martinez Torrecuadrada J, Sanchez Carbayo M, Casal J. Identification of Tumor-associated Autoantigens for the Diagnosis of Colorectal Cancer in Serum Using High Density Protein Microarrays. *Molecular & cellular proteomics*. 2009;8(10):2382-95.
74. Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Moreno V, Suarez A, Fernandez-Acenero MJ, et al. Identification of MST1/STK4 and SULF1 proteins as autoantibody targets for the diagnosis of colorectal cancer by using phage microarrays. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(3):M110 001784. Epub 2011/01/14.

75. Taylor JG, Cheuk AT, Tsang PS, Chung J-Y, Song YK, Desai K, et al. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(11):3395-407.
76. Pelaez-Garcia A, Barderas R, Casal JI. FGFR4. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2012;16(11):6. Epub 808.
77. Gao G, Goldfarb M. Heparin can activate a receptor tyrosine kinase. *EMBO journal*. 1995;14(10):2183-90.
78. Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nature Cell Biology*. 2001;3(7):650-7.
79. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson A, Goetz R, Eliseenkova A, et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *Journal of biological chemistry*. 2007;282(37):26687-95.
80. Sugiyama N, Varjosalo M, Meller P, Lohi J, Chan KM, Zhou Z, et al. FGF receptor-4 (FGFR4) polymorphism acts as an activity switch of a membrane type 1 matrix metalloproteinase-FGFR4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(36):15786-91.
81. Ingvarsen S, Madsen D, Hillig T, Lund L, Holmbeck K, Behrendt N, et al. Dimerization of endogenous MT1-MMP is a regulatory step in the activation of the 72-kDa gelatinase MMP-2 on fibroblasts and fibrosarcoma cells. *Biological Chemistry*. 2008;389(7):943-53.
82. Weinstein M, Xu XL, Ohyama K, Deng CX. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*. 1998;125(18):3615-23.
83. Gutierrez A, Ratliff E, Andres A, Huang X, McKeehan W, Davis R. Bile acids decrease hepatic paraoxonase 1 expression and plasma high-density lipoprotein levels via FXR-mediated signaling of FGFR4. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(2):301-6.
84. Ge H, Zhang J, Gong Y, Gupte J, Ye J, Weiszmann J, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) deficiency improves insulin resistance and glucose metabolism under diet-induced obesity conditions. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30470-80. Epub 2014/09/11.
85. Roidl A, Foo P, Wong W, Mann C, Bechtold S, Berger H. The FGFR4 Y367C mutant is a dominant oncogene in MDA-MB453 breast cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(10):1543-52.
86. Saris CJ, Domen J, Berns A. The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *The EMBO journal*. 1991;10(3):655-64. Epub 1991/03/01.
87. Xie Y, Xu K, Dai B, Guo Z, Jiang T, Chen H, et al. The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 2006;25(1):70-8. Epub 2005/09/28.
88. Yip-Schneider MT, Horie M, Broxmeyer HE. Transcriptional induction of pim-1 protein kinase gene expression by interferon gamma and posttranscriptional effects on costimulation with steel factor. *Blood*. 1995;85(12):3494-502. Epub 1995/06/15.
89. Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity*. 1999;11(6):709-19. Epub 2000/01/08.
90. Wierenga AT, Vellenga E, Schuringa JJ. Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels. *Mol Cell Biol*. 2008;28(21):6668-80. Epub 2008/09/10.
91. Zhu N, Ramirez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA, Gold MR. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2002;168(2):744-54. Epub 2002/01/05.

92. Peltola KJ, Paukku K, Aho TL, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen PJ. Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood*. 2004;103(10):3744-50. Epub 2004/02/07.
93. Eichmann A, Yuan L, Breant C, Alitalo K, Koskinen PJ. Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene*. 2000;19(9):1215-24. Epub 2000/03/14.
94. Bullock AN, Debreczeni JE, Fedorov OY, Nelson A, Marsden BD, Knapp S. Structural basis of inhibitor specificity of the human protooncogene proviral insertion site in moloney murine leukemia virus (PIM-1) kinase. *Journal of medicinal chemistry*. 2005;48(24):7604-14. Epub 2005/11/24.
95. Losman JA, Chen XP, Vuong BQ, Fay S, Rothman PB. Protein phosphatase 2A regulates the stability of Pim protein kinases. *J Biol Chem*. 2003;278(7):4800-5. Epub 2002/12/11.
96. Brault L, Gasser C, Bracher F, Huber K, Knapp S, Schwaller J. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica*. 2010;95(6):1004-15.
97. Aguirre E, Renner O, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C. Genetic Modeling of PIM Proteins in Cancer: Proviral Tagging and Cooperation with Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and Carcinogens. *Frontiers in oncology*. 2014;4:109. Epub 2014/05/27.
98. Beharry Z, Mahajan S, Zemskova M, Lin YW, Tholanikunnel BG, Xia Z, et al. The Pim protein kinases regulate energy metabolism and cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2):528-33. Epub 2010/12/29.
99. Wang Z, Bhattacharya N, Mixter PF, Wei W, Sedivy J, Magnuson NS. Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1593(1):45-55. Epub 2002/11/15.
100. Bachmann M, Hennemann H, Xing PX, Hoffmann I, Moroy T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48319-28. Epub 2004/08/21.
101. Morishita D, Katayama R, Sekimizu K, Tsuruo T, Fujita N. Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res*. 2008;68(13):5076-85. Epub 2008/07/03.
102. Zippo A, De Robertis A, Bardelli M, Galvagni F, Oliviero S. Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood*. 2004;103(12):4536-44. Epub 2004/02/26.
103. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392-401. Epub 2006/03/31.
104. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-9. Epub 2001/05/18.
105. Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol*. 2002;192(3):259-67. Epub 2002/07/19.
106. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*. 2002;296(5570):1046-9. Epub 2002/05/11.
107. Denko NC, Fontana LA, Hudson KM, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Altman R, et al. Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene*. 2003;22(37):5907-14. Epub 2003/08/30.
108. Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature*. 2004;431(7007):405-6. Epub 2004/09/24.
109. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(1):1-12. Epub 2003/12/25.

110. Tarin D, Croft CB. Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *Journal of anatomy*. 1969;105(Pt 1):189-90. Epub 1969/07/01.
111. Boyer B, Thiery JP. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1993;101(4):257-68. Epub 1993/04/01.
112. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*. 1995;154(1):8-20. Epub 1995/01/01.
113. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*. 2003;278(23):21113-23. Epub 2003/04/01.
114. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*. 2003;348(5):403-13. Epub 2003/01/31.
115. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(3):155-66. Epub 2002/05/08.
116. Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, et al. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14):5078-89. Epub 2003/07/02.
117. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol*. 2004;24(1):306-19. Epub 2003/12/16.
118. Herranz N, Pasini D, Diaz VM, Franci C, Gutierrez A, Dave N, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol*. 2008;28(15):4772-81.
119. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):84-9. Epub 2000/02/03.
120. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 10):1959-67. Epub 2003/04/02.
121. Escrivá M, Peiro S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, Montserrat-Sentis B, et al. Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(5):1528-40.
122. Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev*. 2004;18(10):1131-43. Epub 2004/05/25.
123. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39209-16. Epub 2002/08/06.
124. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442-54. Epub 2002/08/22.
125. Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*. 2001;1(1):37-49. Epub 2001/11/13.
126. Acevedo V, Ittmann M, Spencer D. Paths of FGFR-driven tumorigenesis. *Cell cycle*. 2009;8(4):580-8.
127. Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, et al. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol*. 1993;158(2):475-86. Epub 1993/08/01.
128. Kwabi-Addo B, Ropiquet F, Giri D, Ittmann M. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in human prostate cancer. *The Prostate*. 2001;46(2):163-72. Epub 2001/02/15.

129. Chaffer C, Brennan J, Slavin J, Blick T, Thompson E, Williams E. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer research*. 2006;66(23):11271-8.
130. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, et al. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*. 2006;25(37):5134-44. Epub 2006/03/29.
131. Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends Mol Med*. 2013;19(8):447-53. Epub 2013/06/19.
132. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47. Epub 1968/03/01.
133. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980;56(2):289-301. Epub 1980/08/01.
134. Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995;770:70-8. Epub 1995/12/29.
135. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7. Epub 1999/04/02.
136. Batlle R, Alba-Castellon L, Loubat-Casanovas J, Armenteros E, Franci C, Stanisavljevic J, et al. Snail1 controls TGF-beta responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Oncogene*. 2013;32(28):3381-9. Epub 2012/08/08.
137. de Frutos CA, Dacquin R, Vega S, Jurdic P, Machuca-Gayet I, Nieto MA. Snail1 controls bone mass by regulating Runx2 and VDR expression during osteoblast differentiation. *EMBO journal*. 2009;28(6):686-96.
138. Lee YH, Kim SH, Lee YJ, Kang ES, Lee BW, Cha BS, et al. Transcription factor Snail is a novel regulator of adipocyte differentiation via inhibiting the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cell Mol Life Sci*. 2013. Epub 2013/05/22.
139. Alba-Castellon L, Batlle R, Franci C, Fernandez-Acenero MJ, Mazzolini R, Pena R, et al. Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia*. 2014;16(5):413-21.
140. Rosivatz E, Becker KF, Kremmer E, Schott C, Blechschmidt K, Hofler H, et al. Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2006;448(3):277-87. Epub 2005/12/06.
141. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev*. 1994;8(14):1654-63.
142. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-56.
143. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625-38. Epub 2003/04/25.
144. Kant P, Hull MA. Excess body weight and obesity--the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(4):224-38. Epub 2011/03/10.
145. Aune D, Greenwood DC, Chan DS, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, et al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(4):843-52. Epub 2011/09/06.
146. Protani M, Coory M, Martin JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2010;123(3):627-35. Epub 2010/06/24.

147. Cao Y, Ma J. Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(4):486-501. Epub 2011/01/15.
148. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology*. 2011;12(5):489-95. Epub 2011/02/08.
149. Teunissen SC, Wesker W, Kruitwagen C, de Haes HC, Voest EE, de Graeff A. Symptom prevalence in patients with incurable cancer: a systematic review. *Journal of pain and symptom management*. 2007;34(1):94-104. Epub 2007/05/19.
150. Davis MP, Dickerson D. Cachexia and anorexia: cancer's covert killer. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 2000;8(3):180-7. Epub 2000/05/02.
151. Bennani-Baiti N, Davis MP. Cytokines and cancer anorexia cachexia syndrome. *The American journal of hospice & palliative care*. 2008;25(5):407-11. Epub 2008/04/12.
152. Walsh D, Mahmoud F, Barna B. Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 2003;11(1):60-2. Epub 2003/01/16.
153. Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(1):30-45. Epub 2008/11/20.
154. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition*. 2000;130(12):3122S-6S. Epub 2001/01/04.
155. Canas B, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2006;4(4):295-320. Epub 2007/01/05.
156. Comisarow MB, Marshall AG. The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 1996;31(6):581-5. Epub 1996/06/01.
157. Jones AW, Cooper HJ. Dissociation techniques in mass spectrometry-based proteomics. *The Analyst*. 2011;136(17):3419-29. Epub 2011/06/24.
158. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-67. Epub 1999/12/28.
159. Yates JR, Eng JK, Clauser KR, Burlingame AL. Search of sequence databases with uninterpreted high-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1996;7(11):1089-98. Epub 1996/11/01.
160. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*. 2007;4(9):709-12. Epub 2007/08/28.
161. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2002;1(5):376-86.
162. Ong SE, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol Biol*. 2007;359:37-52. Epub 2007/05/09.
163. Dayon L, Hainard A, Licker V, Turck N, Kuhn K, Hochstrasser DF, et al. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Analytical chemistry*. 2008;80(8):2921-31. Epub 2008/03/04.
164. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(12):1154-69. Epub 2004/09/24.



165. Chen X, Smith LM, Bradbury EM. Site-specific mass tagging with stable isotopes in proteins for accurate and efficient protein identification. *Analytical chemistry*. 2000;72(6):1134-43. Epub 2000/03/31.
166. Kruger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubner CA, Forner F, et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*. 2008;134(2):353-64. Epub 2008/07/30.
167. Sury MD, Chen JX, Selbach M. The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(10):2173-83. Epub 2010/06/08.
168. Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, et al. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer*. 2004;110(6):869-74. Epub 2004/06/02.
169. Morikawa K, Walker SM, Jessup JM, Fidler IJ. In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res*. 1988;48(7):1943-8. Epub 1988/04/01.
170. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975;5(1):19-27. Epub 1975/05/01.
171. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature protocols*. 2009;4(1):102-6. Epub 2009/01/10.
172. Ruhe J, Streit S, Hart S, Wong C, Specht K, Knyazev P. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer research*. 2007;67(23):11368-76.
173. Scheel C, Eaton E, Li S, Chaffer C, Reinhardt F, Kah K-J, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*. 2011;145(6):926-40.
174. Sun T, Fu M, Bookout AL, Klier SA, Mangelsdorf DJ. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol*. 2009;23(6):925-31. Epub 2009/03/28.
175. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989;77(1):51-9. Epub 1989/04/15.
176. Barderas R, Desmet J, Timmerman P, Meloen R, Casal J. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(26):9029-34.
177. Strausberg RL, Feingold EA, Klausner RD, Collins FS. The mammalian gene collection. *Science*. 1999;286(5439):455-7. Epub 1999/10/16.
178. Barderas R, Bartolome RA, Fernandez-Acenero MJ, Torres S, Casal JI. High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res*. 2012;72(11):2780-90. Epub 2012/04/17.
179. Zuo D, Mohr SE, Hu Y, Taycher E, Rolfs A, Kramer J, et al. PlasmID: a centralized repository for plasmid clone information and distribution. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D680-4. Epub 2006/11/30.
180. Alfonso P, Nunez A, Madoz Gurpide J, Lombardia L, Sanchez L, Nez A, et al. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics*. 2005;5(10):2602-11.
181. Trudel S, Ely S, Farooqi Y, Affer M, Robbani DF, Chesi M, et al. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood*. 2004;103(9):3521-8. Epub 2004/01/13.
182. Lee SH, Lopes de Menezes D, Vora J, Harris A, Ye H, Nordahl L, et al. In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(10):3633-41. Epub 2005/05/18.

183. Xia Z, Knaak C, Ma J, Beharry ZM, McInnes C, Wang W, et al. Synthesis and evaluation of novel inhibitors of Pim-1 and Pim-2 protein kinases. *Journal of medicinal chemistry*. 2009;52(1):74-86. Epub 2008/12/17.
184. Yang J, Wang J, Chen K, Guo G, Xi R, Rothman PB, et al. eIF4B phosphorylation by pim kinases plays a critical role in cellular transformation by Abl oncogenes. *Cancer Res*. 2013;73(15):4898-908. Epub 2013/06/12.
185. Lin YW, Beharry ZM, Hill EG, Song JH, Wang W, Xia Z, et al. A small molecule inhibitor of Pim protein kinases blocks the growth of precursor T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood*. 2010;115(4):824-33. Epub 2009/12/08.
186. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5. Epub 2012/08/30.
187. Barderas R, Shochat S, Timmerman P, Hollestelle MJ, Martinez-Torrecuadrada JL, Hoppener JW, et al. Designing antibodies for the inhibition of gastrin activity in tumoral cell lines. *Int J Cancer*. 2008;122(10):2351-9. Epub 2008/01/29.
188. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):76-83. Epub 2000/02/03.
189. Spellman DS, Deinhardt K, Darie CC, Chao MV, Neubert TA. Stable isotopic labeling by amino acids in cultured primary neurons: application to brain-derived neurotrophic factor-dependent phosphotyrosine-associated signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(6):1067-76.
190. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6(5):359-62.
191. Kall L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods*. 2007;4(11):923-5. Epub 2007/10/24.
192. Chen D, Shah A, Nguyen H, Loo D, Inder KL, Hill MM. Online quantitative proteomics p-value calculator for permutation-based statistical testing of peptide ratios. *J Proteome Res*. 2014;13(9):4184-91. Epub 2014/07/25.
193. Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Rios D, et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nature biotechnology*. 2014;32(3):223-6.
194. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, Lambert JP, St-Denis NA, Li T, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods*. 2013;10(8):730-6. Epub 2013/08/08.
195. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res*. 2014. Epub 2014/10/30.
196. Kuehn BM. 1000 Genomes Project promises closer look at variation in human genome. *Jama*. 2008;300(23):2715. Epub 2008/12/18.
197. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2010;2010:baq020. Epub 2010/08/07.
198. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, et al. OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*. 2007;9(2):166-80. Epub 2007/03/16.
199. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004;6(1):1-6. Epub 2004/04/08.
200. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature biotechnology*. 2010;28(12):1248-50. Epub 2010/12/09.

201. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):pl1. Epub 2013/04/04.
202. Worth CL, Preissner R, Blundell TL. SDM--a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Web Server issue):W215-22. Epub 2011/05/20.
203. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005;21(13):2933-42. Epub 2005/04/30.
204. Jiang C, Xuan Z, Zhao F, Zhang MQ. TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D137-40. Epub 2007/01/05.
205. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4(1):44-57. Epub 2009/01/10.
206. Sabates-Bellver J, Van der Flier LG, de Palo M, Cattaneo E, Maake C, Rehrauer H, et al. Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Molecular cancer research : MCR*. 2007;5(12):1263-75. Epub 2008/01/04.
207. Skrzypczak M, Goryca K, Rubel T, Paziewska A, Mikula M, Jarosz D, et al. Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data directed for maximization of analytical reliability. *PLoS One*. 2010;5(10). Epub 2010/10/20.
208. Spinola M, Leoni VP, Tanuma J, Pettinicchio A, Frattini M, Signoroni S, et al. FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2005;14(2):415-9. Epub 2005/07/14.
209. Bange J, Prectl D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer research*. 2002;62(3):840-7.
210. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. Epub 2012/11/07.
211. FitzGerald LM, Karlins E, Karyadi DM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Stanford JL, et al. Association of FGFR4 genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2009;12(2):192-7.
212. Yang Y, Zhou Y, Lu M, An Y, Li R, Chen Y, et al. Association between fibroblast growth factor receptor 4 polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis*. 2012;51(7):515-21. Epub 2011/06/10.
213. Auguste P, Gursel DB, Lemiere S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, et al. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res*. 2001;61(4):1717-26. Epub 2001/03/14.
214. Pelaez-Garcia A, Barderas R, Torres S, Hernandez-Varas P, Teixido J, Bonilla F, et al. FGFR4 role in epithelial-mesenchymal transition and its therapeutic value in colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(5):e63695.
215. Cheney IW, Yan S, Appleby T, Walker H, Vo T, Yao N, et al. Identification and structure-activity relationships of substituted pyridones as inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2007;17(6):1679-83. Epub 2007/01/26.
216. Lindberg MJ, Bystrom R, Boknas N, Andersen PM, Oliveberg M. Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(28):9754-9. Epub 2005/07/01.
217. Randles LG, Lappalainen I, Fowler SB, Moore B, Hamill SJ, Clarke J. Using model proteins to quantify the effects of pathogenic mutations in Ig-like proteins. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24216-26. Epub 2006/06/09.

218. Topham CM, Srinivasan N, Blundell TL. Prediction of the stability of protein mutants based on structural environment-dependent amino acid substitution and propensity tables. *Protein engineering*. 1997;10(1):7-21. Epub 1997/01/01.
219. Worth CL, Bickerton GR, Schreyer A, Forman JR, Cheng TM, Lee S, et al. A structural bioinformatics approach to the analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) and their relation to disease. *Journal of bioinformatics and computational biology*. 2007;5(6):1297-318. Epub 2008/01/04.
220. Forman JR, Worth CL, Bickerton GR, Eisen TG, Blundell TL. Structural bioinformatics mutation analysis reveals genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease and suggests molecular mechanisms of tumorigenesis. *Proteins*. 2009;77(1):84-96. Epub 2009/05/02.
221. Counago R, Wilson CJ, Pena MI, Wittung-Stafshede P, Shamoo Y. An adaptive mutation in adenylate kinase that increases organismal fitness is linked to stability-activity trade-offs. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2008;21(1):19-27. Epub 2007/12/21.
222. Gluck F, Hoogland C, Antinori P, Robin X, Nikitin F, Zufferey A, et al. EasyProt--an easy-to-use graphical platform for proteomics data analysis. *J Proteomics*. 2013;79:146-60. Epub 2013/01/02.
223. Lai AY, Wade PA. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(8):588-96.
224. Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2010;24(11):1106-18. Epub 2010/06/03.
225. Seo E, Basu-Roy U, Gunaratne PH, Coarfa C, Lim DS, Basilico C, et al. SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell reports*. 2013;3(6):2075-87. Epub 2013/06/26.
226. Reynolds N, Latos P, Hynes-Allen A, Loos R, Leaford D, O'Shaughnessy A, et al. NuRD Suppresses Pluripotency Gene Expression to Promote Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):583-94.
227. Le Guezennec X, Vermeulen M, Brinkman AB, Hoeijmakers WAM, Cohen A, Lasonder E, et al. MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(3):843-51.
228. Hermann-Kleiter N, Gruber T, Lutz-Nicoladoni C, Thuille N, Fresser F, Labi V, et al. The nuclear orphan receptor NR2F6 suppresses lymphocyte activation and T helper 17-dependent autoimmunity. *Immunity*. 2008;29(2):205-16.
229. Hermann-Kleiter N, Meisel M, Fresser F, Thuille N, Muller M, Roth L, et al. Nuclear orphan receptor NR2F6 directly antagonizes NFAT and RORgammat binding to the IL17a promoter. *Journal of autoimmunity*. 2012;39(4):428-40.
230. Pelaez-Garcia A, Barderas R, Batlle R, Vinas-Castells R, Bartolome RA, Torres S, et al. A Proteomic Analysis Reveals That Snail Regulates the Expression of the Nuclear Orphan Receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and Interleukin 17 (IL-17) to Inhibit Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(2):303-15. Epub 2014/12/17.
231. Anderson KS, LaBaer J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res*. 2005;4(4):1123-33. Epub 2005/08/09.
232. Caron M, Choquet-Kastylevsky G, Joubert-Caron R. Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(7):1115-22. Epub 2007/03/23.
233. Barderas R, Villar-Vazquez R, Fernandez-Acenero MJ, Babel I, Pelaez-Garcia A, Torres S, et al. Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Scientific reports*. 2013;3:2938. Epub 2013/10/16.
234. Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, Thorpe A, Woolston C, Sahin U, et al. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Annals of oncology*. 2007;18(5):868-73.

235. Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer research*. 2000;60(7):1777-88.
236. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JM, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(7):2298-305. Epub 2002/07/13.
237. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Treci O, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(5):1914-8.
238. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Antn LC, et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000;404(6779):770-4.
239. Ulanet D, Torbenson M, Dang CV, Casciola Rosen L, Rosen A, Torbenson M, et al. Unique conformation of cancer autoantigen B23 in hepatoma: a mechanism for specificity in the autoimmune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12361-6.
240. von Mensdorff-Pouilly S, Petrakou E, Kenemans P, van Uffelen K, Verstraeten AA, Snijdwint FG, et al. Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *International journal of cancer*. 2000;86(5):702-12.
241. Wardemann H, Nussenzweig MC. B-cell self-tolerance in humans. *Advances in immunology*. 2007;95:83-110. Epub 2007/09/18.
242. Yurasov S, Nussenzweig MC. Regulation of autoreactive antibodies. *Current opinion in rheumatology*. 2007;19(5):421-6. Epub 2007/09/01.
243. Maio M, Coral S, Sigalotti L, Elisei R, Romei C, Rossi G, et al. Analysis of cancer/testis antigens in sporadic medullary thyroid carcinoma: expression and humoral response to NY-ESO-1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(2):748-54. Epub 2003/02/08.
244. Goodell V, Waisman J, Salazar LG, de la Rosa C, Link J, Coveler AL, et al. Level of HER-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous HER-2/neu-specific immunity. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(3):449-54. Epub 2008/03/06.
245. Hammel P, Leroy-Viard K, Chaumette MT, Villaudy J, Falzone MC, Rouillard D, et al. Correlations between p53-protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1999;81(5):712-8. Epub 1999/05/18.
246. Engelhorn M, Guevara Patino JA, Noffz G, Hooper AT, Lou O, Guevara-Patio J, et al. Autoimmunity and tumor immunity induced by immune responses to mutations in self. *Nature medicine*. 2006;12(2):198-206.
247. Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, Lower M, van de Roemer N, de Graaf J, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res*. 2012;72(5):1081-91. Epub 2012/01/13.
248. Vigneron N, Stroobant V, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer immunity*. 2013;13:15. Epub 2013/07/25.
249. Kosaki R, Gebbia M, Kosaki K, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, et al. Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *American journal of medical genetics*. 1999;82(1):70-6. Epub 1999/01/23.
250. Sirvent A, Benistant C, Roche S. Oncogenic signaling by tyrosine kinases of the SRC family in advanced colorectal cancer. *American journal of cancer research*. 2012;2(4):357-71. Epub 2012/08/04.
251. Irby R, Yeatman TJ, Yeatman T. Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells. *Cancer research*. 2002;62(9):2669-74.
252. Irby RB, Mao WG, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Mao W, et al. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nature Genetics*. 1999;21(2):187-90.

253. Greulich H, Pollock P. Targeting mutant fibroblast growth factor receptors in cancer. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(5):283-92.
254. Ye Y, Shi Y, Zhou Y, Du C, Wang C, Zhan H, et al. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with gastric cancer progression. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(12):3354-61. Epub 2010/09/17.
255. Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(18 Pt 1):6169-78. Epub 2004/09/28.
256. Heinzele C, Gsur A, Hunjadi M, Erdem Z, Gauglhofer C, Stattner S, et al. Differential effects of polymorphic alleles of FGF receptor 4 on colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res*. 2012;72(22):5767-77. Epub 2012/09/14.
257. Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y, Wang F, et al. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell*. 2007;12(6):559-71. Epub 2007/12/11.
258. Martinez-Torrecuadrada J, Cifuentes G, Lopez-Serra P, Saenz P, Martinez A, Casal JI. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(17):6280-90. Epub 2005/09/08.
259. Martinez-Torrecuadrada JL, Cheung LH, Lopez-Serra P, Barderas R, Canamero M, Ferreira S, et al. Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(4):862-73. Epub 2008/04/17.
260. French DM, Lin BC, Wang M, Adams C, Shek T, Hotzel K, et al. Targeting FGFR4 inhibits hepatocellular carcinoma in preclinical mouse models. *PLoS One*. 2012;7(5):e36713. Epub 2012/05/23.
261. Hachem A, Nandi S. The oncogene mcts1. *Translational oncogenomics*. 2007;2:79-84. Epub 2007/01/01.
262. Levenson AS, Thurn KE, Simons LA, Veliceasa D, Jarrett J, Osipo C, et al. MCT-1 oncogene contributes to increased in vivo tumorigenicity of MCF7 cells by promotion of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Cancer Res*. 2005;65(23):10651-6. Epub 2005/12/03.
263. Tsang M, Dawid IB. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004;2004(228):pe17. Epub 2004/04/15.
264. Wang B, Nguyen M, Chang NC, Shore GC. Fis1, Bap31 and the kiss of death between mitochondria and endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 2011;30(3):451-2. Epub 2011/02/03.
265. Nguyen M, Breckenridge DG, Ducret A, Shore GC. Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):6731-40. Epub 2000/08/25.
266. Breckenridge DG, Nguyen M, Kuppig S, Reth M, Shore GC. The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4331-6. Epub 2002/03/28.
267. Chen H, Yuan Y, Zhang C, Luo A, Ding F, Ma J, et al. Involvement of S100A14 protein in cell invasion by affecting expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-2 via p53-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2012;287(21):17109-19. Epub 2012/03/28.
268. Shah N, Pang B, Yeoh KG, Thorn S, Chen CS, Lilly MB, et al. Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer - a molecular and therapeutic appraisal. *Eur J Cancer*. 2008;44(15):2144-51. Epub 2008/08/22.
269. Hu XF, Li J, Vandervalk S, Wang Z, Magnuson NS, Xing PX. PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *J Clin Invest*. 2009;119(2):362-75. Epub 2009/01/17.

270. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412(6844):341-6. Epub 2001/07/19.
271. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7. Epub 2012/07/20.
272. Weirauch U, Beckmann N, Thomas M, Grunweller A, Huber K, Bracher F, et al. Functional role and therapeutic potential of the pim-1 kinase in colon carcinoma. *Neoplasia*. 2013;15(7):783-94. Epub 2013/07/03.
273. Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J, Iruela-Arispe ML, Zhang J, Matusik R, et al. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*. 2003;4(3):223-38. Epub 2003/10/03.
274. Walpen T, Kalus I, Schwaller J, Peier MA, Battegay EJ, Humar R. Nuclear PIM1 confers resistance to rapamycin-impaired endothelial proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;429(1-2):24-30. Epub 2012/11/08.
275. Barderas R, Babel I, Casal JI. Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl*. 2010;4(2):159-78. Epub 2010/12/08.
276. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-22. Epub 2012/03/24.
277. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Current opinion in genetics & development*. 2001;11(1):54-9. Epub 2001/02/13.
278. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 2001;264(1):169-84. Epub 2001/03/10.
279. Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):49-59. Epub 2009/12/19.
280. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(11):807-21. Epub 2003/10/15.
281. Davies MP, Rudland PS, Robertson L, Parry EW, Jolicoeur P, Barraclough R. Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene*. 1996;13(8):1631-7. Epub 1996/10/17.
282. Ryan DG, Taliana L, Sun L, Wei ZG, Masur SK, Lavker RM. Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(10):4255-62. Epub 2003/09/26.
283. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal-Redux. *Cancer immunology research*. 2015;3(1):1-11. Epub 2015/01/09.
284. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1650-9. Epub 1986/12/25.
285. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem*. 2004;279(4):2559-67.
286. Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(3):388-99.
287. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, et al. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol*. 2010;185(11):6947-59.
288. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 inhibits adipogenesis in part via C/EBPalpha, PPARGamma and Kruppel-like factors. *Cytokine*. 2013;61(3):898-905.

289. Balani D, Aeberli D, Hofstetter W, Seitz M. Interleukin-17A stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor release by murine osteoblasts in the presence of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and inhibits murine osteoclast development in vitro. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(2):436-46.
290. Kondo M, Yamaoka K, Sonomoto K, Fukuyo S, Oshita K, Okada Y, et al. IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2013;8(11):e79463.
291. Li L, Xie X, Qin J, Jeha GS, Saha PK, Yan J, et al. The nuclear orphan receptor COUP-TFII plays an essential role in adipogenesis, glucose homeostasis, and energy metabolism. *Cell Metab*. 2009;9(1):77-87.
292. Xu Z, Yu S, Hsu CH, Eguchi J, Rosen ED. The orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II is a critical regulator of adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2421-6.
293. Papp D, Lenti K, Modos D, Fazekas D, Dul Z, Turei D, et al. The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. *FEBS letters*. 2012;586(13):1795-802.
294. Warnecke M, Oster H, Revelli JP, Alvarez-Bolado G, Eichele G. Abnormal development of the locus coeruleus in Ear2(Nr2f6)-deficient mice impairs the functionality of the forebrain clock and affects nociception. *Genes Dev*. 2005;19(5):614-25.
295. Avram D, Ishmael JE, Nevriy DJ, Peterson VJ, Lee SH, Dowell P, et al. Heterodimeric interactions between chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor family members ARP1 and ear2. *J Biol Chem*. 1999;274(20):14331-6.
296. Albers M, Kranz H, Kober I, Kaiser C, Klink M, Suckow J, et al. Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(2):205-13.
297. Stark C, Breitkreutz BJ, Chatr-Aryamontri A, Boucher L, Oughtred R, Livstone MS, et al. The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D698-704.
298. Jung DJ, Sung HS, Goo YW, Lee HM, Park OK, Jung SY, et al. Novel transcription coactivator complex containing activating signal cointegrator 1. *Mol Cell Biol*. 2002;22(14):5203-11.
299. Prasad TS, Kandasamy K, Pandey A. Human Protein Reference Database and Human Proteinpedia as discovery tools for systems biology. *Methods Mol Biol*. 2009;577:67-79.
300. Lee YS, Kim HJ, Lee HJ, Lee JW, Chun SY, Ko SK, et al. Activating signal cointegrator 1 is highly expressed in murine testicular Leydig cells and enhances the ligand-dependent transactivation of androgen receptor. *Biology of reproduction*. 2002;67(5):1580-7.
301. Iannone MA, Consler TG, Pearce KH, Stimmel JB, Parks DJ, Gray JG. Multiplexed molecular interactions of nuclear receptors using fluorescent microspheres. *Cytometry*. 2001;44(4):326-37.
302. Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 2012;22(6):709-24.
303. Xu B, Gerin I, Miao H, Vu-Phan D, Johnson CN, Xu R, et al. Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PLoS One*. 2010;5(12):e14199.





## **ANEXOS**



Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los resultados obtenidos han sido recogidos en una serie de artículos cuyas referencias aparecen aquí indicadas y, a continuación, aparecen completos:

1. **Pelaez-Garcia, A.**, R. Barderas, and J. I. Casal. "FGFR4." *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 16, no. 11 (11/2012 2012): 6.
2. **Pelaez-Garcia, A.**, R. Barderas, S. Torres, P. Hernandez-Varas, J. Teixido, F. Bonilla, A. G. de Herreros, and J. I. Casal. "FGFR4 Role in Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Therapeutic Value in Colorectal Cancer." *PLoS One* 8, no. 5 (2013): e63695.
3. **Pelaez-Garcia, A.**, R. Barderas, R. Battle, R. Vinas-Castells, R. A. Bartolome, S. Torres, M. Mendes, et al. "A Proteomic Analysis Reveals That Snail Regulates the Expression of the Nuclear Orphan Receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and Interleukin 17 (IL-17) to Inhibit Adipocyte Differentiation." *Mol Cell Proteomics* 14, no. 2 (Feb 2015): 303-15.

Durante la realización de la tesis doctoral se ha colaborado en otros proyectos del grupo como se puede observar en las siguientes publicaciones:

1. Babel, I., R. Barderas, **A. Pelaez-Garcia**, and J. I. Casal. "Antibodies on Demand: A Fast Method for the Production of Human Scfvs with Minimal Amounts of Antigen." *BMC Biotechnol* 11 (2011): 61.
2. Barderas, R., M. Mendes, S. Torres, R. A. Bartolome, M. Lopez-Lucendo, R. Villar-Vazquez, **A. Pelaez-Garcia**, et al. "In-Depth Characterization of the Secretome of Colorectal Cancer Metastatic Cells Identifies Key Proteins in Cell Adhesion, Migration, and Invasion." *Mol Cell Proteomics* 12, no. 6 (Jun 2013): 1602-20.
3. Barderas, R., R. Villar-Vazquez, M. J. Fernandez-Acenero, I. Babel, **A. Pelaez-Garcia**, S. Torres, and J. I. Casal. "Sporadic Colon Cancer Murine Models Demonstrate the Value of Autoantibody Detection for Preclinical Cancer Diagnosis." *Sci Rep* 3 (2013): 2938.
4. Torres, S., R. A. Bartolome, M. Mendes, R. Barderas, M. J. Fernandez-Acenero, **A. Pelaez-Garcia**, C. Pena, et al. "Proteome Profiling of Cancer-Associated Fibroblasts Identifies Novel Proinflammatory Signatures and Prognostic Markers for Colorectal Cancer." *Clin Cancer Res* 19, no. 21 (Nov 1 2013): 6006-19.
5. Bartolome, R. A., **A. Pelaez-Garcia**, I. Gomez, S. Torres, M. J. Fernandez-Acenero, B. Escudero-Paniagua, J. I. Imbaud, and J. I. Casal. "An Rgd Motif Present in Cadherin 17 Induces Integrin Activation and Tumor Growth." [In eng]. *J Biol Chem* 289, no. 50 (Dec 12 2014): 34801-1.

## Gene Section

### Review

# FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4)

Alberto Peláez-García, Rodrigo Barderas, J Ignacio Casal

Functional Proteomics Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), 28040 Madrid, Spain (APG, JIC), Departamento Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain (RB)

Published in Atlas Database: May 2012

Online updated version : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/FGFR4ID512ch5q35.html>  
DOI: 10.4267/2042/48227

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 France Licence.  
© 2012 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

## Identity

### Other names:

CD334, JTK2, TKF

### HGNC (Hugo):

FGFR4

### Location:

5q35.2

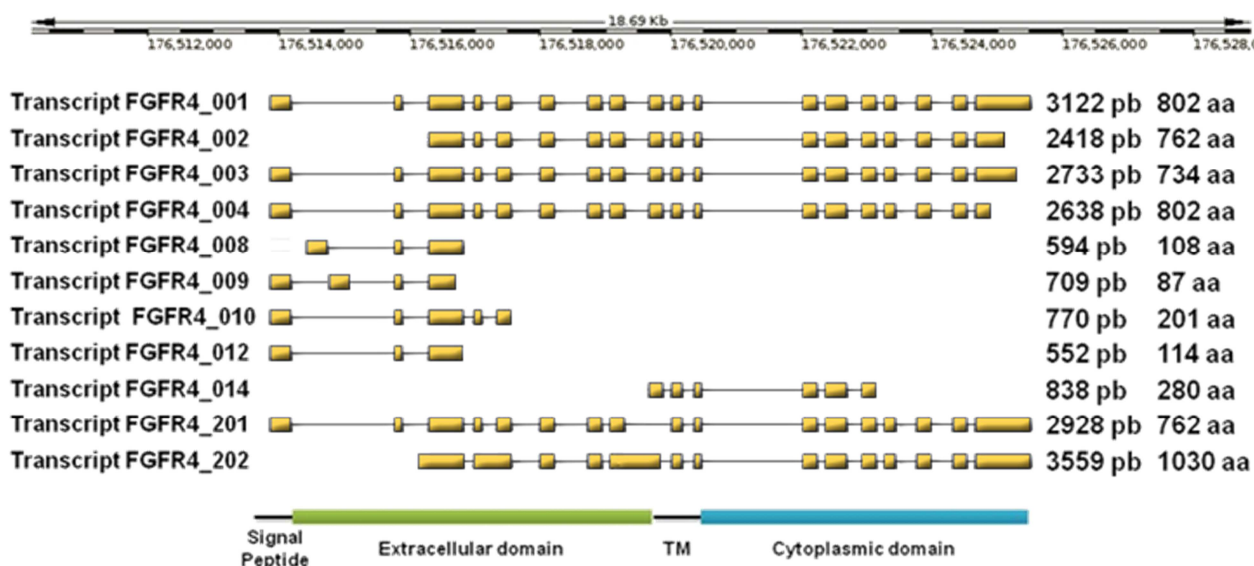
## DNA/RNA

### Description

The DNA was cloned in 1991 (Partanen et al., 1991). 18.9 kb; 18 exons.

### Transcription

3.1 kb mRNA; alternative splicing gives rise to 18 transcripts with evidence of 11 transcripts at protein level.



FGFR4 comprises an extracellular domain, a transmembrane domain, and an intracellular domain. FGFR4 alternative splicing has been described, with up to 18 different transcripts ranging from 552 to 3559 bp, (evidence of 11 transcripts at protein level ranging from 87 to 1030 aminoacids).

# FGFR4 Role in Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Therapeutic Value in Colorectal Cancer

Alberto Peláez-García<sup>1‡</sup>, Rodrigo Barderas<sup>1‡</sup>, Sofía Torres<sup>1</sup>, Pablo Hernández-Varas<sup>2</sup>, Joaquín Teixidó<sup>2</sup>, Félix Bonilla<sup>3</sup>, Antonio García de Herreros<sup>4</sup>, J. Ignacio Casal<sup>1\*</sup>

**1** Department of Celular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain, **2** Chemokines and Cell Migration Laboratory, CIB-CSIC, Madrid, Spain, **3** Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain, **4** IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

## Abstract

Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) is vital in early development and tissue repair. FGFR4 expression levels are very restricted in adult tissues, except in several solid tumors including colorectal cancer, which showed overexpression of FGFR4. Here, FGFR4 mutation analysis discarded the presence of activating mutations, other than Arg<sup>388</sup>, in different colorectal cancer cell lines and tumoral samples. Stable shRNA FGFR4-silencing in SW480 and SW48 cell lines resulted in a significant decrease in cell proliferation, adhesion, cell migration and invasion. This decrease in the tumorigenic and invasive capabilities of colorectal cancer cells was accompanied by a decrease of Snail, Twist and TGFβ gene expression levels and an increase of E-cadherin, causing a reversion to a more epithelial phenotype, in three different cell lines. In addition, FGFR4-signaling activated the oncogenic SRC, ERK1/2 and AKT pathways in colon cancer cells and promoted an increase in cell survival. The relevance of FGFR4 in tumor growth was supported by two different strategies. Kinase inhibitors abrogated FGFR4-related cell growth and signaling pathways at the same extent than FGFR4-silenced cells. Specific FGFR4-targeting using antibodies provoked a similar reduction in cell growth. Moreover, FGFR4 knock-down cells displayed a reduced capacity for *in vivo* tumor formation and angiogenesis in nude mice. Collectively, our data support a crucial role for FGFR4 in tumorigenesis, invasion and survival in colorectal cancer. In addition, FGFR4 targeting demonstrated its applicability for colorectal cancer therapy.

**Citation:** Peláez-García A, Barderas R, Torres S, Hernández-Varas P, Teixidó J, et al. (2013) FGFR4 Role in Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Therapeutic Value in Colorectal Cancer. PLoS ONE 8(5): e63695. doi:10.1371/journal.pone.0063695

**Editor:** Qian Tao, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong

**Received:** November 9, 2012; **Accepted:** April 6, 2013; **Published:** May 16, 2013

**Copyright:** © 2013 Peláez-García et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was supported by grant BIO2009-08818 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, grant to established research groups (AECC) and grant S2011/BMD-2344/Colomics2 from Comunidad de Madrid. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: icasal@cib.csic.es

‡ Current address: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid, Spain

‡ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The fibroblast growth factors (FGFs) have been implicated in multiple biological processes during embryo development, wound healing, haematopoiesis and angiogenesis [1]. They bind to four FGF receptors (FGFR) designated FGFR1-4 [2]. The FGFRs structure includes a ligand-binding domain that contains three different immunoglobulin-like domains (called Ig I, Ig II and Ig III). The ligand domain is followed by a single transmembrane domain and an intracellular cytoplasmic tyrosine kinase domain. FGFR4 displays the most restricted pattern of expression to embryonic development and tissue repair [3,4] when compared to the other three FGFRs, and its expression levels decline postnatally. In adults, FGFR4 is expressed in muscle myofibroblasts during regeneration following injury, but not in mature skeletal muscle [5]. FGF receptors dysregulation has been shown to play an important role in cancer development and progression. These alterations have been proposed to occur through overexpression, gene amplification or mutation [6].

Previously, our group identified FGFR4 as an autoantibody target in colorectal cancer (CRC) using protein microarrays [7]. In

addition, we observed a clear overexpression of FGFR4 in colorectal cancer cell lines (particularly in 2 out of 4 highly metastatic colorectal cancer cell lines) with a potential association of FGFR4-expression to late stages colorectal cancer [8]. FGFR4 has been reported to be over-expressed in human breast, prostate, colon, rhabdomyosarcoma, gastric, pancreatic, hepatocellular and pituitary adenocarcinomas [4,9,10,11,12,13,14,15], where it can contribute to tumor progression by multiple mechanisms [4,9]. Moreover, FGFR4 expression levels were associated with metastatic disease and poor survival in gastric, lung, breast adenocarcinoma and rhabdomyosarcoma [16,17,18]. FGFR4 somatic mutations are infrequent in cancer [11,19,20,21]; Arg<sup>388</sup> is the most common single nucleotide polymorphism (SNP) in FGFR4, which provokes enhanced stability and prolonged activation of the receptor. It has been associated with poor prognosis for positive node breast cancer, high-grade soft-tissue sarcoma, head and neck and lung squamous cell carcinoma [9,16,18,22,23].

Among the 18 FGF ligands, FGF19 binds preferentially FGFR4 [24], although it binds also FGFR1. Binding occurs in a complex comprising heparin, FGFR4 and two FGF molecules, which triggers FGFR dimerization, leading to autophosphorylation of

# A Proteomic Analysis Reveals That Snail Regulates the Expression of the Nuclear Orphan Receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and Interleukin 17 (IL-17) to Inhibit Adipocyte Differentiation\*

Alberto Peláez-García‡, Rodrigo Barderas§, Raquel Batlle¶, Rosa Viñas-Castells¶, Rubén A. Bartolomé‡, Sofía Torres‡, Marta Mendes‡, María Lopez-Lucendo‡, Rocco Mazzolini¶, Félix Bonilla||, Antonio García de Herreros¶, and J. Ignacio Casal‡\*\*

Adipogenesis requires a differentiation program driven by multiple transcription factors, where PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  play a central role. Recent findings indicate that Snail inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 and murine mesenchymal stem cells (mMSC). An in-depth quantitative SILAC analysis of the nuclear fraction of Snail-induced alterations of 3T3-L1 cells was carried out. In total, 2251 overlapping proteins were simultaneously quantified in forward and reverse experiments. We observed 574 proteins deregulated by Snail1 using a fold-change  $\geq 1.5$ , with 111 up- and 463 down-regulated proteins, respectively. Among other proteins, multiple transcription factors such as Trip4, OsmR, Nr2f6, Cbx6, and Prrx1 were down-regulated. Results were validated in 3T3-L1 cells and mMSC cells by Western blot and quantitative PCR. Knock-down experiments in 3T3-L1 cells demonstrated that only Nr2f6 (and Trip4 at minor extent) was required for adipocyte differentiation. Ectopic expression of Nr2f6 reversed the effects of Snail1 and promoted adipogenesis. Because Nr2f6 inhibits the expression of IL-17, we tested the effect of Snail on IL-17 expression. IL-17 and TNF $\alpha$  were among the most up-regulated pro-inflammatory cytokines in Snail-transfected 3T3-L1 and mMSC cells. Furthermore, the blocking of IL-17 activity in Snail-trans-

ected cells promoted adipocyte differentiation, reverting Snail inhibition. In summary, Snail inhibits adipogenesis through a down-regulation of Nr2f6, which in turn facilitates the expression of IL-17, an anti-adipogenic cytokine. These results would support a novel and important role for Snail and Nr2f6 in obesity control. *Molecular & Cellular Proteomics* 14: 10.1074/mcp.M114.045328, 303–315, 2015.

Adipogenic differentiation is driven by a complex cascade of transcription factors (TFs)<sup>1</sup> and cell signaling molecules that lead to the expression of the master regulators CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) (1) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) (2) family proteins. In a sequential process, C/EBP $\delta$  and C/EBP $\beta$  are initially induced and followed by C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  expression. These two master TFs induce the final program of gene expression for adipocyte differentiation.

The transcription factor Snail1 is a major inducer of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) during embryonic development and cancer progression (3, 4). Snail1 expression is very restricted in adult individuals (5), but reappears to drive the EMT process that confers promigratory, invasive, and stem cell properties to cancer epithelial cells (4). During this process, Snail represses the expression of E-cadherin and promotes the expression of mesenchymal genes like vimen-

From the ‡Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain; §Departamento de Biochemistry and Molecular Biology Department I, Universidad Complutense de Madrid, Spain; ¶IIMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ||Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain

Received, October 1, 2014 and in revised form, November 25, 2014  
Published, MCP Papers in Press, December 10, 2014, DOI 10.1074/mcp.M114.045328

Author contributions: A.G. and J.C. designed research; A.P., R. Barderas, R. Batlle, R.V., R.A.B., S.T., M.M., M.L., and R.M. performed research; R. Batlle, F.B., and A.G. contributed new reagents or analytic tools; A.P., R. Barderas, R.V., R.A.B., S.T., M.M., M.L., R.M., F.B., and J.C. analyzed data; R. Barderas and J.C. wrote the paper.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TF, transcription factor; Cbx6, chromobox homolog 6; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; DAVID, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; EMT, epithelial-mesenchymal transition; IL-17, interleukin 17; mMSCs, murine mesenchymal stem cells; Nr2f6, Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6); OsmR, oncostatin M receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Prrx1, paired related homeobox 1, qPCR, quantitative PCR; RLU, relative luminescence units; SILAC, stable isotopic labeling amino acids in culture; Trip4, thyroid hormone receptor interactor 4.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Antibodies on demand: a fast method for the production of human scFvs with minimal amounts of antigen

Ingrid Babel<sup>†</sup>, Rodrigo Barderas<sup>†</sup>, Alberto Peláez-García and J Ignacio Casal<sup>\*</sup>

## Abstract

**Background:** Antibodies constitute a powerful tool to study protein function, protein localization and protein-protein interactions, as well as for diagnostic and therapeutic purposes. High-throughput antibody development requires faster methodologies with lower antigen consumption.

**Results:** Here, we describe a novel methodology to select human monoclonal recombinant antibodies by combining *in vitro* protein expression, phage display antibody libraries and antibody microarrays. The application of this combination of methodologies permitted us to generate human single-chain variable fragments (scFvs) against two proteins: green fluorescent protein (GFP) and thioredoxin (Trx) in a short time, using as low as 5 µg of purified protein. These scFvs showed specific reactivity against their respective targets and worked well by ELISA and western blot. The scFvs were able to recognise as low as 31 ng of protein of their respective targets by western blot.

**Conclusion:** This work describes a novel and miniaturized methodology to obtain human monoclonal recombinant antibodies against any target in a shorter time than other methodologies using only 5 µg of protein. The protocol could be easily adapted to a high-throughput procedure for antibody production.

**Keywords:** scFv antibodies, *in vitro* protein expression, phage display, antibody microarrays

## Background

A crucial challenge of the proteome era is to use the genome information for a better understanding of protein expression, protein cellular distribution and functionality discovery not only in normal but also in pathological processes [1,2]. Antibody development against every human protein is a prerequisite to improve this knowledge. Several high-throughput alternatives have been developed to generate antibodies to the entire proteome [3-5]. The Human Protein Atlas initiative (<http://www.proteinatlas.org/>) [3,4], the Sanger Institute Antibody Atlas Database, the NCI Clinical Proteomics [5], the HUPO human antibody initiative (<http://www.hupo.org/research/hai/>) [6], and several EU-funded consortia (ProteomeBinders, AffinityProteome, Affinomics

[7-9]; <http://www.proteomebinders.org>) are all good examples of these alternatives.

The production of mAbs and/or rabbit antibodies requires large amounts of antigens, it is time-consuming due to the immunization step of the animals and, in the case of mAbs, the screening and clone selection can take from 6 months to 1 year [10]. The development of recombinant antibodies in single-chain Fv (scFv) formats is a good alternative to obtain high-affinity antibodies against any target without time-consuming immunization [11-14]. The affinity of scFvs for their targets might be comparable to that of mAbs or pAbs and in some cases even higher [15]. As a general rule, scFvs possess several advantages in comparison to IgG or Fabs such as higher tissue penetrance and more rapid clarification [16,17]. Moreover, antibody phage display, M13-based human libraries, is becoming particularly useful for the production and development of antibodies for immunotherapy in different diseases [18-21]. *In vitro* phage

\* Correspondence: [icasal@cib.csic.es](mailto:icasal@cib.csic.es)

† Contributed equally

Functional Proteomics Laboratory. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain



# In-depth Characterization of the Secretome of Colorectal Cancer Metastatic Cells Identifies Key Proteins in Cell Adhesion, Migration, and Invasion\*

Rodrigo Barderas<sup>a,b,c</sup>, Marta Mendes<sup>a,b,d</sup>, Sofia Torres<sup>a,e</sup>, Rubén A. Bartolomé<sup>a,f</sup>, María López-Lucendo<sup>g</sup>, Roi Villar-Vázquez<sup>a,h</sup>, Alberto Peláez-García<sup>a,i</sup>, Eduardo Fuente<sup>j</sup>, Félix Bonilla<sup>k</sup>, and J. Ignacio Casal<sup>a,l</sup>

Liver metastasis in colorectal cancer is the major cause of cancer-related deaths. To identify and characterize proteins associated with colon cancer metastasis, we have compared the conditioned serum-free medium of highly metastatic KM12SM colorectal cancer cells with the parental, poorly metastatic KM12C cells using quantitative stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) analyses on a linear ion trap-Orbitrap Velos mass spectrometer. In total, 1337 proteins were simultaneously identified in SILAC forward and reverse experiments. For quantification, 1098 proteins were selected in both experiments, with 155 proteins showing >1.5-fold change. About 52% of these proteins were secreted directly or using alternative secretion pathways. GDF15, S100A8/A9, and SERPINI1 showed capacity to discriminate cancer serum samples from healthy controls using ELISAs. *In silico* analyses of deregulated proteins in the secretome of metastatic cells showed a major abundance of proteins involved in cell adhesion, migration, and invasion. To characterize the tumorigenic and metastatic properties of some top up- and down-regulated proteins, we used siRNA silencing and antibody blocking. Knockdown expression of NEO1, SERPINI1, and PODXL showed a significant effect on cellular adhesion. Silencing or blocking experiments with SOSTDC1, CTSS, EFNA3, CD137L/TNFSF9, ZG16B, and Midkine caused a significant decrease in migration and invasion of highly metastatic cells. In addition, silencing of SOSTDC1, EFNA3, and CD137L/TNFSF9 reduced liver colonization capacity of KM12SM cells. Finally, the panel of six proteins involved in invasion showed association with poor prognosis and overall survival after dataset analysis of gene alterations. In summary, we have defined a collection of proteins that are relevant for understanding the mechanisms underlying

ing adhesion, migration, invasion, and metastasis in colorectal cancer. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 10.1074/mcp.M112.022848, 1602–1620, 2013.

Despite the efforts for colorectal cancer (CRC)<sup>1</sup> prevention using different strategies (1–6), 30–40% of patients have regionally advanced disease or suffer from metastasis when diagnosed (7). Moreover, half of the CRC patients will develop recurrence and liver metastasis within 5 years (8). Although genetic changes leading to the development of sporadic colorectal cancer primary tumors in intestinal cells have been relatively well characterized (9), further efforts are necessary to better understand the biology of CRC metastasis and to identify associated markers that can be used as diagnostic/

<sup>1</sup> The abbreviations used are: CRC, colorectal cancer; AGR2, anterior gradient 2 homolog; AGR3, anterior gradient 3 homolog; ARF4, ADP-ribosylation factor 4; ARF5, ADP-ribosylation factor 5; BMP, bone morphogenetic proteins; BSSP-4/PRSS22, brain-specific serine protease 4; CA125, cancer antigen 125; CD137L/TNFSF9, tumor necrosis factor ligand superfamily member 9; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; CTSS, cathepsin S; CXCR4, chemokine (CXC motif) receptor 4; DCC, deleted in colorectal carcinoma; EFNA3, ephrin-A3; EphA4, ephrin type-A receptor 4; FGF2, fibroblast growth factor 2; GDF15, growth/differentiation factor 15; IGFBP2, insulin-like growth factor-binding protein 2; IGFBP7, insulin-like growth factor-binding protein 7; IL-13, interleukin 13; IL13R $\alpha$ 2, interleukin 13 receptor  $\alpha$ 2; IPA, ingenuity pathway analysis; ITGA6, integrin  $\alpha$ -6; ITGB4, integrin  $\beta$ -4; iTRAQ, isobaric tag for relative and absolute quantification; KLK10, kallikrein-10; KLK6, kallikrein-6; LAMA5, laminin subunit  $\alpha$ -5; LAMC1, laminin subunit  $\gamma$ -1; LUM, lumican; MDK, Midkine; MMP1, interstitial collagenase; NEO1, neogenin; OS, overall survival; PODXL, podocalyxin-like protein 1; S100A8/9, S100 calcium-binding protein A8/A9; SERPINI1, neuroserpin; SH3KBP1, Src homology 3 domain-containing kinase-binding protein 1; SILAC, stable isotope labeling by amino acids in cell culture; SOSTDC1, sclerostin domain-containing protein 1; THBS2, thrombospondin 2; TLR2, Toll-like receptor 2; TRAF1, TNF receptor-associated factor 1; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; VGF, neurosecretory protein VGF; ZG16B, zymogen granule protein 16 homolog B; ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve; EGFR, EGF receptor; PSM, peptide spectrum match.

From the <sup>a</sup>Functional Proteomics Laboratory and <sup>g</sup>Proteomics Facility, Centro de Investigaciones Biológicas, 28040 Madrid, the <sup>h</sup>Hospital de Cabueñes, 33394 Gijón, and the <sup>k</sup>Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, 28222 Madrid, Spain

Received August 3, 2012, and in revised form, February 18, 2013

Published, MCP Papers in Press, February 26, 2013, DOI 10.1074/mcp.M112.022848



OPEN

SUBJECT AREAS:

AUTOIMMUNITY  
DIAGNOSTIC MARKERS  
CANCER SCREENING  
COLORECTAL CANCER

Received  
21 June 2013

Accepted  
23 September 2013

Published  
15 October 2013

Correspondence and  
requests for materials  
should be addressed to  
J.I.C. (jicasal@cib.csic.  
es)

\* These authors  
contributed equally to  
this work.

† Current address:  
Biochemistry and  
Molecular Biology I  
Department. Facultad  
de Ciencias Químicas.  
Universidad  
Complutense de  
Madrid. 28040  
Madrid.

# Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis

Rodrigo Barderas<sup>1\*†</sup>, Roi Villar-Vazquez<sup>1\*</sup>, María Jesús Fernández-Aceñero<sup>2</sup>, Ingrid Babel<sup>1</sup>, Alberto Peláez-García<sup>1</sup>, Sofía Torres<sup>1</sup> & J. Ignacio Casal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). 28040 Madrid. Spain, <sup>2</sup>Pathology Department. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Spain.

Although autoantibody detection has been proposed for diagnosis of colorectal cancer, little is known about their initial production and development correlation with cancer progression. Azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS)-treated mice developed colon adenocarcinoma in the distal colon similar to human sporadic colon cancer. We assessed this model together with AOM and DSS-only models for their applicability to early detection of cancer. All AOM/DSS-treated mice produced autoantibodies to tumor-associated antigens analogous to those observed in human colon cancer patients. Autoantibody response was related to tumor antigen overexpression. Cancer autoantibodies were detected 21 days after starting treatment, when no malignant histopathological features were detectable, and they increased according to tumor progression. When carcinogenesis was induced separately by AOM or DSS, only those mice that developed malignant lesions produced significant levels of autoantibodies. These findings demonstrate that autoantibody development is an early event in tumorigenesis and validates its use for preclinical colon cancer diagnosis.

Cancer patients develop an immune humoral response against tumor-associated antigens (TAAs). Autoantibody responses have been mainly associated to cancers with an elevated inflammatory component such as colon<sup>1–3</sup>, prostate<sup>4</sup>, ovarian<sup>5,6</sup>, lung<sup>7,8</sup> or breast cancer<sup>9</sup>, among others. In addition to elevated specificity and sensitivity, advantages of this strategy include easy and minimally invasive sample collection for diagnosis. Moreover, the long stability of the antibody molecules allows for retrospective studies in samples stored for long periods<sup>10,11</sup>. We hypothesized that murine colon cancer models could mimic the human humoral response to cancer and provide us with a clear insight into the production, kinetics and evolution of autoantibody development, including a clear answer to their potential application to cancer diagnosis in preclinical and early colon cancer stages.

We used azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS), individually or in combination, to generate different inducible mouse models of colon cancer in order to study the effect of carcinogenicity and/or inflammation on the induction of autoantibodies. AOM is a chemical agent that initiates cancer by alkylation of DNA, favoring the introduction of mutations<sup>12</sup>. Intraperitoneal administration of 3 to 6 AOM-only injections induces the development of spontaneous tumors in distal colon within 7–10 months depending on the mouse strain<sup>13</sup>. On the other hand, DSS supply in drinking water induces inflammatory cell infiltration of the mucosa propria, ulceration and bloody diarrhea<sup>14</sup>. DSS disrupts the colon epithelial lining, provoking severe colitis and ulcerative colitis-like neoplasia lesions mainly found in the distal colon<sup>15,16</sup>. Administration of 3 to 4 and up to 9 DSS cycles in drinking water results in the development of colorectal dysplasia and adenocarcinoma in a subset of treated mice<sup>14,17</sup>. Number, severity of lesions and percentage of affected mice depends on the mouse strains<sup>14,17,18</sup>.

The combined treatment with AOM/DSS is currently used as a common mouse model of colitis-associated colon cancer (CAC). Tumors induced by AOM/DSS occur preferentially at the distal part of the colon, which is the predominant localization of spontaneous colorectal cancer (CRC) in humans. Although metastasis is very rare in this model<sup>19</sup>, many steps in cancer development including formation of aberrant crypt foci, polyps, adenomas and carcinomas are shared between CRC and CAC. It has been extensively used for the study of inflammation and its association with colon cancer development<sup>20,21</sup>. This model has been very useful for the elucidation of the role of TNF- $\alpha$ , IL6, NF $\kappa$ B and other molecules in the initiation and promotion of inflammation-associated tumor growth (see<sup>22</sup> for a review), but it has not been applied for autoimmunity and biomarker studies. Tumor

## Proteome Profiling of Cancer-Associated Fibroblasts Identifies Novel Proinflammatory Signatures and Prognostic Markers for Colorectal Cancer

Sofia Torres<sup>1</sup>, Rubén A. Bartolomé<sup>1</sup>, Marta Mendes<sup>1</sup>, Rodrigo Barderas<sup>1</sup>, M. Jesús Fernandez-Aceñero<sup>3</sup>, Alberto Peláez-García<sup>1</sup>, Cristina Peña<sup>4</sup>, María Lopez-Lucendo<sup>2</sup>, Roi Villar-Vázquez<sup>1</sup>, Antonio García de Herreros<sup>5</sup>, Felix Bonilla<sup>4</sup>, and J. Ignacio Casal<sup>1</sup>

### Abstract

**Purpose:** Cancer-associated fibroblasts (CAF) are essential components of the stroma that play a critical role in cancer progression. This study aimed to identify novel CAFs markers that might contribute to the invasion and the prognosis of colorectal cancer.

**Experimental Design:** The azoxymethane/dextran sodium sulfate mouse model of sporadic colon cancer represents an adequate source for the isolation of CAFs and normal fibroblasts. By using the explants technique, we purified CAFs and normal fibroblasts from colon tissues. Whole-cell extracts and supernatants were subjected to in-depth quantitative proteomic analysis by tandem mass spectrometry. Further validations of upregulated proteins in CAFs were carried out by chemokine microarray and immunohistochemical analyses of mouse and human tissues.

**Results:** Using a fold-change of 1.4 or more, we found 132 and 125 differentially expressed proteins in whole-cell extracts and supernatants, respectively. We found CAFs-associated proinflammatory and desmoplastic signatures. The proinflammatory signature was composed of several cytokines. Among them, CCL2 and CCL8 caused an increase in migration and invasion of colorectal cancer KM12 cells. The desmoplastic signature was composed of 30 secreted proteins. In mouse and human samples, expression of LTBP2, CDH11, OLFML3, and, particularly, FSTL1 was significantly increased in the tumoral stroma, without significant expression in the cancer epithelial cells. The combination of CALU and CDH11 stromal expression showed a significant association with disease-free survival and poor prognosis.

**Conclusion:** We have identified LTBP2, CDH11, OLFML3, and FSTL1 as selective biomarkers of cancer stroma, and CALU and CDH11 as candidate stromal biomarkers of prognostic significance in colon cancer. *Clin Cancer Res*; 19(21); 6006–19. ©2013 AACR.

### Introduction

The tumor stroma comprises most of the cancer mass and is mainly composed of fibroblasts and endothelial cells,

although it also contains infiltrating immune cells and pericytes (1). Stroma nurtures cancer cells and facilitates tumor development and invasion. Clinical and experimental data support the hypothesis that tumor stroma promotes invasion and cancer metastasis (2). Within stroma, fibroblasts are key components for cancer progression. Stromal fibroblasts are called activated fibroblasts, myofibroblasts, or cancer-associated fibroblasts (CAF), and they acquire a particular phenotype similar to fibroblasts present in skin wounds. Carcinoma progression is associated with an increase in the production of fibrosis, known as desmoplasia, similar to that present in wound healing (3). CAFs respond to profibrotic and promigratory factors, such as TGF- $\beta$ , platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), or fibroblast growth factor 2 (FGF2), thereby promoting cancer progression. They are characterized by increased expression of myofibroblastic markers such as  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), FSP1, or prolyl-4-hydroxylase (4, 5). Cancer fibroblasts proliferate more than their normal counterparts and secrete more constituents of the extracellular matrix (ECM) and ECM-degrading

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine; <sup>2</sup>Proteomics Core Facility, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC); <sup>3</sup>Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz; <sup>4</sup>Department of Oncology, Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid; and <sup>5</sup>IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

S. Torres and R.A. Bartolomé contributed equally to this work.

Current address for R. Barderas: Department of Biochemistry and Molecular Biology, I. Universidad Complutense, Madrid, Spain.

**Corresponding Author:** J. Ignacio Casal, Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-918373112; Fax: 34-915360432; E-mail: icasal@cib.csic.es

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1130

©2013 American Association for Cancer Research.

An RGD motif present in cadherin 17 induces integrin activation and tumor growth\*

Rubén A. Bartolomé<sup>1</sup>, Alberto Peláez-García<sup>1</sup>, Inmaculada Gomez<sup>2</sup>, Sofía Torres<sup>1</sup>, María Jesús Fernandez-Aceñero<sup>3</sup>, Beatriz Escudero-Paniagua<sup>1</sup>, J. Ignacio Imbaud<sup>2</sup> and J. Ignacio Casal<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Cellular and Molecular Medicine. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Protein Alternatives SL. Tres Cantos. Madrid. Spain

<sup>3</sup> Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

\*Running title: *CDH17-RGD motif is critical for integrin activation*

To whom correspondence should be addressed: J. Ignacio Casal, Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. Spain. Phone: +34 918373112; Fax: +34 91 5360432; e-mail: icasal@cib.csic.es

**Keywords:** RGD motif, cadherin, integrin, signaling, colon cancer metastasis

**Background:** The interaction between cadherin 17 and  $\alpha 2\beta 1$  integrin promotes cell adhesion and proliferation

**Results:** Cadherin 17 contains an RGD motif that constitutes the critical switch for integrin binding and activation

**Conclusion:** The cadherin RGD motif is a critical ligand for tumor growth and metastasis

**Significance:** Cadherin 17 is the first known integrin-ligand RGD-cadherin. Other RGD-cadherins might play important roles in cancer metastasis.

## ABSTRACT

Little is known about the mechanism of integrin activation by cadherin 17 (CDH17). Here, we observed the presence of a tripeptide motif RGD in the domain 6 of the human CDH17 sequence and other cadherins such as cadherin 5 and cadherin 6. The use of CDH17 RAD mutants demonstrated a considerable decrease of proliferation and adhesion in RKO and KM12SM colon cancer cells. Furthermore, RGD peptides inhibited the adhesion of both cell lines to a recombinant CDH17 domain 6. The RGD motif added exogenously to the cells provoked a change in  $\beta 1$  integrin to active, high-affinity, conformation and an increase in FAK and ERK1/2 activation. *In vivo*

experiments with Swiss nude mice demonstrated that cancer cells expressing the CDH17 RAD mutant showed a considerable delay in tumor growth and liver homing. CDH17 RGD effects were also active in pancreatic cancer cells. Our results suggest that  $\alpha 2\beta 1$  integrin interacts with two different ligands, collagen IV and CDH17, using two different binding sites. In summary, the RGD binding motif constitutes a switch for the integrin pathway activation and shows a novel capacity of CDH17 as integrin ligand. This motif could be targeted to avoid metastatic dissemination in those tumors overexpressing CDH17 and other RGD-containing cadherins.

Cadherin 17 (CDH17), also known as liver-intestine cadherin (LI-cadherin), is a non-canonical, 7D-domain cadherin. Its sequence is formed by 7 extracellular domains and a very short cytoplasmic domain (1). CDH17 is present in fetal liver and gastrointestinal tract, exhibiting elevated expression during embryogenesis (2). The gene is silenced in adult healthy liver and gut. However, CDH17 is expressed again in gastric cancer, esophagus carcinoma, pancreatic cancer (3) and hepatocarcinoma (4). In primary colon cancer tumors, poorly-differentiated tumors, as well as in lymph nodes, CDH17 is expressed at low levels (5).